

# **Mechanismen der antikörpervermittelten T-Zell-Depletion *in vivo* im Maus-Modell**

## **Dissertation**

zum Erlangen des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Vivienne Engelschalt

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Makschies

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter:

1. PD Dr. Michal Or-Guil
2. Prof. Dr. Richard A. KroczeK
3. Prof. DR. Alf Hamann

Tag der mündlichen Prüfung: 29.07.2010



„In diesem Leben ist jeder mutig, der nicht aufgibt.“

Paul McCartney

„Die wichtigste Voraussetzung für Wissen ist immer Neugier.“

Erich Rutenmüller

Dank an die Menschen, die mich dies nie vergessen lassen

*Helene, Finja und Arthur*



## ***Zusammenfassung***

Monoklonale Antikörper (mAk) werden bereits erfolgreich zur therapeutischen Depletion verschiedener Zellpopulationen *in vivo* verwendet, die Mechanismen der Depletion sind jedoch unklar geblieben. In dieser Arbeit wurden im Mausmodell die molekularen Grundlagen der CD4<sup>+</sup> T-Zelldepletion (CD4 TZD) nach einmaliger Gabe (i.p.) von 100 µg des anti-CD4-mAk YTS191.1 untersucht. Dabei konnte eine starke Korrelation zwischen Depletion und der Modulation des CD4-Moleküls von der Oberfläche beobachtet werden. Gleichzeitig zeigten sich organabhängige Unterschiede, sowohl im zeitlichen Verlauf, als auch in der Effizienz der Depletion. Im Thymus konnten weder Depletion noch Modulation detektiert werden, in Milz und Lymphknoten (Lk) war die CD4 TZD nach starker CD4-Modulation bereits nach 48 h mit 80-90 % maximal, in den Peyer-Plaques jedoch niedriger und verzögert (50-60 % nach 72 h). Anhand C3-defizienter Mäuse konnte ferner kein wesentlicher Beitrag von Komplement an der CD4 TZD beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte durch die Verwendung verschiedener Fcγ-Rezeptor (FcγR)-defizienter Mäuse (FcγRI, FcγRII, FcγRIII, FcγRI/III und FcRγ) wie auch durch die Blockade des FcγRIV eine starke, zudem organabhängige Beteiligung von FcγR an der CD4 TZD gezeigt werden. Während in der Milz die CD4 TZD von FcγRIV vermittelt wurde, waren in den Lk und Peyer-Plaques FcγRI/III involviert. Diese Befunde korrelierten mit der starken Expression von FcγRIV in Milz, Lunge, Darm, Niere und Leber, während in den Lk nur eine schwache und in Thymus und Peyer-Plaques keine Expression detektiert werden konnte. Innerhalb der Milz konnten erstmalig F4/80<sup>hoch</sup> Makrophagen als FcγRIV<sup>+</sup> identifiziert und somit als potenzielle Effektorzellen der CD4 TZD bestimmt werden. Der direkte Vergleich der Depletion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit der Depletion von ICOS<sup>+</sup> T-Zellen verdeutlichte darüber hinaus, dass die Effizienz der Zelldepletion nicht nur von den Eigenschaften des verwendeten mAk, sondern auch von denen des Zielmoleküls abhängig ist.

### **Schlagworte:**

mAk, CD4<sup>+</sup> T-Zelldepletion (CD4 TZD), *in vivo* Mausmodell, Fcγ-Rezeptoren (FcγR), Makrophagen

## ***Abstract***

Monoclonal antibodies (mAb) are efficiently used for the therapeutic depletion of various cells *in vivo* yet the mechanisms of depletion are still unclear. In this work, the molecular principles of CD4<sup>+</sup> T cell depletion (CD4 Tcd) by a single application of 100 µg of the anti-CD4 mAb YTS191.1.1 were investigated in the mouse. A strong correlation between the depletion and the surface modulation of the CD4 molecule could be observed. At the same time, organ-dependent differences in the kinetics as well as in the efficiency of depletion could be detected. In the thymus, neither modulation nor depletion were detectable. In the spleen and the lymph nodes (Ln), the modulation was strong and the depletion was maximal (80-90%) 48 h after mAb treatment. Interestingly, both modulation and depletion were decreased and delayed (50-60% after 72 h) in the Peyer's patches. By using C3-deficient mice, no major contribution of complement to the CD4 Tcd was seen. On the contrary, with the help of different Fcγ-receptor (FcγR)-deficient mice (FcγRI, FcγRII, FcγRIII, FcγRI/III, and FcRγ) and through the blockade of FcγRIV, a strong organ dependent involvement of FcγR could be shown. While the depletion in the spleen was clearly dependent on FcγRIV, in the Ln and the Peyer's patches, FcγRI/III were involved. These findings correlated with the strong expression of FcγRIV in the spleen, the lung, the colon, the kidney, and the liver, while in the Ln the expression was weak and undetectable in the thymus and the Peyer's patches. For the first time, F4/80<sup>high</sup> macrophages in the spleen could be identified as also being FcγRIV<sup>+</sup>, and are therefore considered as the potential effector cells of the CD4 Tcd. The direct comparison of the depletion of T cells via CD4 or ICOS pointed out that the target cell depletion is not only dependent on the properties of the mAb used, but also on those of the target molecule.

### **Keywords:**

mAb, CD4<sup>+</sup> T cell depletion (CD4 Tcd), *in vivo* mouse model, Fcγ receptors (FcγR), macrophages

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	VII
----------------------------	-----

Tabellenverzeichnis.....	X
--------------------------	---

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
---------------------------	----------

1.1 Verwendung monoklonaler Antikörper zur Therapie von Krankheiten ...	1
1.1.1 Kostimulatorische Moleküle in der Therapie .....	2
1.1.2 CD4 als Zielmolekül der Therapie .....	3
1.2 Grundlagen der Zielzelldepletion am Beispiel des CD4-Moleküls .....	4
1.3 Mögliche Mechanismen der Zelldepletion.....	5
1.3.1 Komplementvermittelte Reaktionen .....	5
1.3.2 Fcγ-Rezeptoren.....	8
1.3.3 Apoptose.....	11
1.4 Aufgabenstellung .....	13

<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>14</b>
--------------------------------------	-----------

2.1 Verwendete Chemikalien und Materialien.....	14
2.2 Zellbiologische Methoden.....	14
2.2.1 Puffer .....	14
2.2.2 Zellkulturmedien .....	14
2.2.3 Isolierung muriner Zellen.....	15
2.2.4 Anreicherung von TZ mittels Nylonwolle .....	15
2.2.5 Durchflusszytometrie .....	15
2.2.6 Magnetische Sortierung.....	19
2.2.7 Durchflusszytometrische Sortierung .....	20
2.2.8 Markierung von Zellen.....	21
2.3 Mäuse .....	22
2.4 Adoptiver Transfer von Zellen und Immunisierung .....	23
2.5 Depletion von Zellen in vivo.....	23
2.5.1 Depletionsprotokoll .....	23
2.5.2 Analyse der CD4 <sup>+</sup> T-Zelldepletion (CD4 TZD).....	23
2.6 Inhibition von Caspase-Aktivität .....	24
2.7 Elektronenmikroskopie .....	24
2.8 Immunohistochemie (IHC) .....	25

2.8.1	Präparation von Kryoschnitten.....	25
2.8.2	Präparation von Zytospins.....	25
2.8.3	Fixierung .....	25
2.8.4	Immunohistochemische Färbung .....	26
2.8.5	Nachweis von Eisen .....	27
2.9	Isotypbestimmung mittels ELISA.....	28
2.10	Statistische Analysen .....	28
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>30</b>
3.1	Etablierung des <i>in vivo</i> CD4 T-Zelldepletion-Modells.....	30
3.1.1	Test auf gegenseitige Blockade zweier anti-CD4 mAbs <i>in vitro</i> .....	30
3.1.2	Die mAk-vermittelte CD4 TZD ist mit verschiedenen Dosen und in verschiedenen Organen nachweisbar .....	31
3.1.3	CD4 wird auf der Zelloberfläche moduliert, weshalb die Zielzellen als CD19 <sup>-</sup> CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> Population definiert werden .....	32
3.1.4	Kinetik der CD4-Modulation <i>in vivo</i> .....	33
3.1.5	Die mAk-vermittelte CD4 TZD ist zeitabhängig.....	34
3.2	Das CD4 Oberflächenmolekül wird nach Kontakt mit mAk von der Oberfläche moduliert .....	36
3.2.1	Das CD4-Oberflächenmolekül wird moduliert, wobei CD4 <sup>+</sup> TZ-externe Faktoren beteiligt sind.....	36
3.2.2	Das CD4-Molekül wird internalisiert.....	39
3.3	Analyse der CD4 TZD <i>in vivo</i> .....	40
3.3.1	Der Thymus ist von der YTS191.1-vermittelten CD4 TZD ausgeschlossen .....	40
3.3.2	Depletion von CD4 <sup>+</sup> TZ-Subtypen.....	41
3.3.3	Depletion von aktivierten CD4 <sup>+</sup> TZ .....	45
3.3.4	Beteiligung von Komplement oder Fcγ-Rezeptoren an der YTS191.1-vermittelten CD4 TZD <i>in vivo</i> .....	48
3.4	Expression von FcγRIV im Gewebe und auf Milzzellpopulationen im Ruhezustand.....	52
3.4.1	FcγRIV ist im Gewebe unterschiedlich stark exprimiert und kolokalisiert mit F4/80-positiven Zellen.....	52
3.4.2	Korrelation der FcγRIV-Expression mit Makrophagen-Markern in der Milz .....	54
3.4.3	Durchflusszytometrische FcγRIV-Expressionsanalyse auf Milzpopulationen im Ruhezustand.....	56



3.5	Charakterisierung der potenziellen Effektorzellen der YTS191.1-vermittelten CD4 TZD .....	60
3.5.1	Durchflusszytometrische Sortierung und Charakterisierung von Makrophagen-Populationen in der Milz .....	60
3.5.2	Die Autofluoreszenz der F4/80 <sup>hoch</sup> FcγRIV <sup>+</sup> Makrophagen korreliert mit der Präsenz endogener Eisen-Partikeln.....	61
3.5.3	Die endogenen Eisenpartikel aggregieren in erythrozyten-ähnlichen Strukturen innerhalb der F4/80 <sup>hoch</sup> Zellen.....	62
3.6	Visualisierung der YTS191.1-vermittelten CD4 TZD <i>in vivo</i> in der Milz .....	63
3.6.1	Magnetpartikel sind für Markierung von Zellen geeignet.....	64
3.6.2	Verwendung von Magnetpartikeln im Modell der CD4 TZD.....	65
3.6.3	CFSE kann nicht innerhalb von phagozytierenden Zellen nachgewiesen werden.....	67
3.7	Apoptose als möglicher Mechanismus der YTS191.1-vermittelten CD4 TZD .....	68
3.7.1	Nach mAk-Gabe wird die Expression von Fas und FasL induziert.....	69
3.7.2	Die CD4 TZD wird durch Einsatz eines Pan-Caspase-Inhibitors nicht beeinflusst.....	70
3.8	Die mAk-vermittelte Zelldepletion ist vom Ziel-Molekül abhängig .....	70
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>72</b>
4.1	Evaluierung des etablierten <i>in vivo</i> -Modells der CD4 TZD .....	72
4.1.1	Die CD4 TZD beginnt erst 6 h nach mAk-Behandlung.....	72
4.1.2	Die Analyse der CD4 TZD wird durch die CD4-Modulation nach Bindung eines mAk beeinflusst .....	73
4.2	Die mAk-vermittelte CD4 TZD erfolgt hauptsächlich über FcγRs .....	74
4.2.1	Komplementabhängige Reaktionen sind kein Hauptmechanismus der mAk-vermittelten CD4 TZD .....	74
4.2.2	Apoptose konnte als Effektormechanismus der CD4 TZD nicht nachgewiesen werden .....	75
4.2.3	FcγR sind die Haupteffektormoleküle der mAk-vermittelten CD4 TZD.....	78
4.3	Potenzieller Mechanismus der mAk-vermittelten CD4 TZD .....	87
4.4	Die Depletion von ICOS <sup>+</sup> Zellen unterscheidet sich von der CD4 TZD .....	88

<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>90</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>101</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>103</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Überblick über die verschiedenen Möglichkeiten der Komplement-Aktivierung .....	7
Abb. 2	Überblick über die Familie der Fc $\gamma$ -Rezeptoren in Mensch und Maus .....	9
Abb. 3	Durchflusszytometrische Analyse.....	19
Abb. 4	Test auf gegenseitige Blockade der beiden anti-CD4 mAk GK1.5 und YTS191.1 .....	31
Abb. 5	Die Depletion mit unterschiedlichen Mengen mAk in verschiedenen lymphatischen Organen ist vergleichbar .....	32
Abb. 6	Definition der Analyse-Population in der CD4 TZD als CD3+CD8- Zellen...	33
Abb. 7	Modulation des CD4-Oberflächenmoleküls nach Kontakt mit mAk in vivo ..	34
Abb. 8	Kinetik der CD4 TZD in der Milz.....	35
Abb. 9	Kinetik der CD4 TZD in Lk und Peyer-Plaques .....	35
Abb. 10	Modulation des CD4-Oberflächenmoleküls ist durch Internalisierung bedingt und hängt von CD4 <sup>+</sup> TZ-externem Faktor ab .....	38
Abb. 11	Internalisierung des CD4-Oberflächenmoleküls nach Kontakt mit mAk <i>in vitro</i> .....	40
Abb. 12	Im Thymus erfolgt keine mAk-vermittelte CD4 TZD .....	41
Abb. 13	Die Subtypen von CD4 <sup>+</sup> TZ setzen sich in verschiedenen Organen unterschiedlich zusammen .....	42
Abb. 14	Die Frequenzen der TZ-Subtypen variieren in Abhängigkeit von der untersuchten TZ-Population.....	43
Abb. 15	Depletion von CD4 <sup>+</sup> TZ-Subtypen <i>in vivo</i> .....	44

Abb. 16	Die CD4-Expression auf CD4 <sup>+</sup> TZ-Subtypen in verschiedenen Organen im Ruhezustand ist vergleichbar .....	45
Abb. 17	Schema der Depletion von zeitlich unterschiedlich aktivierten Zielzellen.....	46
Abb. 18	Aktivierte und nicht-aktivierte CD4 <sup>+</sup> TZ werden gleichermaßen <i>in vivo</i> depletiert.....	47
Abb. 19	Transferierte und endogene CD4 <sup>+</sup> TZ werden während der Aktivierung <i>in vivo</i> gleichermaßen depletiert .....	48
Abb. 20	Die YTS191.1-vermittelte CD4 TZD ist größtenteils C3-unabhängig .....	49
Abb. 21	Die YTS191.1-induzierte CD4 TZD wird Organ-abhängig von verschiedenen FcγR vermittelt.....	50
Abb. 22	<i>In vivo</i> Blockade von FcγRIV reduziert die mAk-vermittelte CD4 TZD in Milz und Lk.....	51
Abb. 23	FcγRIV wird in lymphatischen Organen differenziell exprimiert .....	53
Abb. 24	FcγRIV wird in allen nicht-lymphatischen Organen stark exprimiert .....	54
Abb. 25	Die FcγRIV-Expression kolokalisiert mit F4/80-Expression und endogenem Eisen in der roten Pulpa der Milz.....	55
Abb. 26	Analyse der FcγRIV-Expression auf verschiedenen Milzpopulationen.....	57
Abb. 27	Positiv magnetisch sortierte FcγRIV <sup>+</sup> Zellen sind teilweise autofluoreszent ...	58
Abb. 28	FcγRIV <sup>+</sup> Milzzellen exprimieren F4/80 und CD11c.....	59
Abb. 29	Analyse der FcγRIV-Expression durchflusszytometrisch sortierter F4/80 <sup>+</sup> Milzzellen.....	61
Abb. 30	Endogenes Eisen kann nur in F4/80 <sup>hoch</sup> Milzzellen detektiert werden .....	62
Abb. 31	F4/80 <sup>hoch</sup> Milzzellen enthalten partikelreiche Strukturen.....	62
Abb. 32	F4/80 <sup>hoch</sup> Milzzellen enthalten Eisen in erythrozytenähnlichen Strukturen.....	63

Abb. 33	Magnetpartikelbeladene Zellen können mittels IHC nachgewiesen werden ...	64
Abb. 34	Die Detektion von Magnetpartikeln mittels IHC im Modell der CD4 TZD ist ungenügend .....	66
Abb. 35	CFSE kann innerhalb von F4/80-exprimierenden Zellen nicht nachgewiesen werden .....	68
Abb. 36	Analyse der Fas- und FasL-Expression im Modell der CD4 TZD .....	69
Abb. 37	Der Pan-Caspase-Inhibitor Q-VD-OPH hat keinen Einfluss auf die CD4 TZD <i>in vivo</i> .....	70
Abb. 38	Im Vergleich zur CD4 TZD werden ICOS <sup>+</sup> Zellen maximal zu 50 % reduziert .....	71

## **Tabellenverzeichnis**

Tab. 1:	Übersicht der verwendeten Fluorochrome .....	16
Tab. 2:	Übersicht über die verwendeten mAk .....	16

# 1 Einleitung

## 1.1 Verwendung monoklonaler Antikörper zur Therapie von Krankheiten

Antikörper sind natürlich im Organismus vorkommende Proteine, welche die verschiedensten Strukturen (Antigene) spezifisch erkennen und binden können. Die Immunglobuline werden von Plasmazellen gebildet und sind sowohl in angeborene als auch in adaptive Immunreaktionen involviert. Antikörper setzen sich aus einer leichten und einer schweren Kette zusammen, die durch kovalente Disulfidbrücken verbunden sind, und können in eine variable (Fab-Fragment) und eine konstante Region (Fc-Fragment) unterteilt werden. Da die schwere Kette mehrere konstante Domänen besitzt, existieren auch mehrere verschiedene Ig-Isotypen. Monoklonale Antikörper (mAk) werden von einem einzigen Plasmazell-Klon gebildet und sind in allen Eigenschaften identisch.

Monoklonale Antikörper werden bereits als Heilmittel in der Behandlung von Autoimmunkrankheiten wie Rheumatischer Arthritis (RA), Diabetes und Systemischem Lupus Erythematosus (SLE) verwendet. Auch in der Transplantationsmedizin und zur Bekämpfung von Humaner-Immundefizienz-Viren (HIV) werden mAk eingesetzt (Jacobson et al., 2009). Die Therapie von Krankheiten mit mAk beruht auf dem Prinzip, dass verschiedene Zellen des Immunsystems spezifische Oberflächenmoleküle exprimieren und dann durch die spezifische Bindung des mAk an diese Moleküle unterschiedliche Reaktionen ausgelöst werden. So kann beispielsweise durch die Bindung der variablen Region des mAk an dasselbe Epitop des Moleküls, an das auch der Ligand binden würde, die Interaktion eines Rezeptor-Ligand-Paares blockiert oder in Abwesenheit des natürlichen Interaktionspartners ein Signal induziert werden. Über die konstante Region des mAk können sowohl phagozytotische (Depletion) als auch inflammatorische oder zytotoxische Prozesse in Interaktion mit Fc- oder Komplement-Rezeptor-tragenden Zellen ausgelöst werden, wie im Folgenden beschrieben wird. Die in dieser Arbeit untersuchten Zielzellen sind T-Zellen (TZ), welche sowohl (teilweise induzierbare) kostimulatorische als auch konstitutive, populationsspezifische Oberflächenmoleküle, wie CD8 oder CD4, exprimieren.

### **1.1.1 Kostimulatorische Moleküle in der Therapie**

Für eine vollständige Aktivierung einer TZ ist neben dem TZR-Signal noch ein zweites, kostimulierendes Signal nötig, das das TZR-Signal moduliert (Lafferty and Cunningham, 1975). Daher werden kostimulatorische Moleküle wie CD28, 4-1BB, CTLA-4 und ICOS ebenfalls als Zielmoleküle in der Immuntherapie verwendet (KroczeK and Hamelmann, 2005; Riley and June, 2005). So kann beispielsweise die Blockade der Kostimulatoren auf autoreaktiven CD4<sup>+</sup> TZ Anergie induzieren (Podojil and Miller, 2009). Die Behandlung mit antagonistischem anti-CD137 (4-1BB) mAk zeigt Wirkung in chronischer GVHD (Graft versus host disease), EAE, RA, SLE und Experimenteller Autoimmun-Uveitis. Anti-CD137 mAk bewirken einerseits die Depletion von autoreaktiven CD4<sup>+</sup> TZ über Fas-vermittelte Apoptose (AICD), einem Mechanismus, auf den später eingegangen wird. Andererseits sind anti-CD137 mAk auch an der Beseitigung von autoreaktiven B-Zellen (BZ) beteiligt, wobei IFN- $\gamma$  produzierende CD8<sup>+</sup> TZ (Zytotoxizität) involviert sind (Kim et al., 2007).

#### **1.1.1.1 ICOS und Autoimmunität**

ICOS (induzierbarer Kostimulator) ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie und sowohl strukturell als auch funktionell mit CD28 verwandt (Hutloff et al., 1999). Die Expression von ICOS ist TZ-spezifisch und wird auf naiven Zellen erst durch Aktivierung signifikant exprimiert und nach der Aktivierung wieder herunterreguliert (Hutloff et al., 1999; KroczeK et al., 2004). Eine konstitutive ICOS-Expression nach Aktivierung wird von regulatorischen TZ und Effektor-T-Gedächtniszellen beibehalten (Burmeister et al., 2008). Der einzige Ligand, ICOSL, wird hauptsächlich auf BZ, Dendritischen Zellen (DZ) und Monozyten/Makrophagen exprimiert und kann auf Monozyten durch IFN- $\gamma$  heraufreguliert werden (Aicher et al., 2000). Es wurde gezeigt, dass ICOS in die Proliferation und das Überleben von TZ sowie humorale Immunantworten involviert ist (Burmeister et al., 2008; Grimbacher et al., 2003).

Für ICOS wurde eine Beteiligung an einer Reihe von (Auto-) Immunkrankheiten nachgewiesen. So ist ICOS an inflammatorischen Darmerkrankungen (Morbus Crohn, Colitis) (Sato et al., 2004) sowie der Entwicklung von Darmkrebs (Chen et al., 2003) beteiligt. Für Lupus (Ding et al., 2006; Hutloff et al., 2004), Myasthenia gravis



(Muskelschwäche) (Scott et al., 2004) und RA (Okamoto et al., 2003; Shilling et al., 2006) konnte ebenfalls eine ICOS-Beteiligung nachgewiesen werden. Der Beitrag von ICOS an EAE wird kontrovers diskutiert, wobei eher keine Beteiligung dieses Moleküls angenommen wird. In einer Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass T-Gedächtniszellen beteiligt sind und eine späte Blockade der ICOS-ICOSL-Interaktion die Krankheit verhindert (Elyaman et al., 2008). Unbestritten ist die Rolle von ICOS in allergischen Reaktionen im Allgemeinen (Bellinghausen et al., 2004; Chialda et al., 2005; Gonzalo et al., 2001) und Atemwegserkrankungen wie Asthma im Speziellen (Beier et al., 2004; Gonzalo et al., 2001; Kroczeck and Hamelmann, 2005; Shilling et al., 2006). Außerdem erwies sich die Gabe von blockierenden anti-ICOS oder anti-ICOSL mAk als wirksam gegen Transplantat-Abstoßungen (Guillonneau et al., 2005; Guo et al., 2004; Hara et al., 2006; Hubbard et al., 2005; Kashizuka et al., 2005). Die Depletion, d.h. die vollständige Beseitigung, ICOS<sup>+</sup> pathogener Zellen könnte daher durchaus einen weiteren therapeutischen Ansatz über die reine Blockade der ICOS-ICOSL-Interaktion hinaus darstellen.

### **1.1.2 CD4 als Zielmolekül der Therapie**

CD4 als Oberflächenmolekül einer großen TZ-Population ist ein geeignetes Ziel in der mAk-basierten Therapie. Das CD4 Molekül ist ein membrangebundenes Glykoprotein und fungiert als Ko-Rezeptor des T-Zell-Rezeptors (TZR), wobei es durch gleichzeitig stattfindende Bindung an MHCII-Moleküle das TZR-Signal verstärken kann (Hepburn et al., 2003; Owens et al., 1987). Die Bindung eines Liganden wie MHCII oder IL-16 (Akiyama et al., 2009) (oder eines mAk) an CD4 allein kann jedoch zur Abbremsung der TZ-Aktivierung führen (Cole et al., 1989; Janssen et al., 2000; Newell et al., 1990) und so immunologische Toleranz der CD4<sup>+</sup> TZ bewirken (Choy et al., 1998; Wang et al., 2007).

CD4 ist nicht nur ein Ko-Rezeptor des TZR sondern auch die Binde- und -Eintrittsstelle von HIV. Die Behandlung von HIV-Patienten mit dem humanisierten anti-CD4 mAk Ibalizumab, führte zu einer Verminderung der Virus-RNA-Last im Blut, was auf die Inhibition des Virus-Eintritts in die CD4<sup>+</sup> TZ zurückzuführen ist (Jacobson et al., 2009).

In der Behandlung von RA werden sowohl depletierende als auch blockierende anti-CD4 mAk verabreicht. Blockierende, toleranzinduzierende Reagenzien erzielten dabei die besten klinischen Resultate (Choy et al., 1998).

## 1.2 Grundlagen der Zielzelledepletion am Beispiel des CD4-Moleküls

Gegen CD4 gerichtete mAk wurden in den letzten 25 Jahren intensiv untersucht (Rider et al., 2007). So gehörte die Arbeit von Cobbold et al. (1984) zu den ersten, die sich mit der Anwendung von mAk *in vivo* befassten. Darin wurde eine Reihe von mAk gegen verschiedene TZ-Antigene in der Ratte generiert und auf ihre depletierenden Eigenschaften im Maus-Modell einer Haut-Transplantation getestet. Der wirksamste Antikörper dieser Testreihe war der anti-CD4 mAk YTS191.1 des Isotyps IgG2b, der die Transplantat-Abstoßung durch Depletion der T-Effektorzellen verhinderte. Wofsy et al. (1985) konnten durch Applikation eines anderen CD4-spezifischen mAk (GK1.5; Ratte-IgG2b) ebenfalls eine vollständige Depletion von CD4<sup>+</sup> TZ erzielen. Komplementvermittelte Reaktionen wurden bereits in dieser Studie aufgrund von erfolgreicher Depletion in C5-defizienten Tieren als Hauptmechanismus der Depletion ausgeschlossen. Die Autoren der Studie wiesen vielmehr auf eine Phagozytose der CD4<sup>+</sup> TZ durch Fc- und Komplement-Rezeptor-tragende Zellen als Mechanismus der CD4<sup>+</sup> T-Zelldepletion (CD4 TZD) hin. Experimentell wurden Makrophagen (CD11b<sup>+</sup> Zellen) als Effektorzellen der Depletion von Jamali et al. (1992) *in vitro* identifiziert.

Apoptose als weiterer möglicher Wirk-Mechanismus von anti-CD4-mAks wurde erstmals ausführlich in der Studie von Newell et al. (1990) *in vitro* untersucht. Die Behandlung von Thymozyten mit anti-CD4 mAk, Kreuzvernetzung durch polyklonales Serum und nachfolgende Stimulation der Zellen über anti-TCRαβ mAk führte zu verminderter Proliferation und zu vermehrtem Zelltod. Oyaizu et al. (1997) postulierten später die Abhängigkeit dieser Apoptose von der Interaktion von CD95 (Fas) mit seinem Partnermolekül CD95L (FasL) auf Monozyten.

Howie et al. (1994) untersuchten in ihrem Modell der CD4 TZD erstmals spezielle CD4<sup>+</sup> TZ-Subpopulationen und beobachteten eine präferenzielle Depletion naiver CD4<sup>+</sup> TZ (CD4<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>).

Der Einfluss des mAk-Isotypes auf die Depletion wurde von Alters et al. (1990) in einem EAE-Modell nachgewiesen. Unter GK1.5-Derivaten mit unterschiedlichen Maus-Isotypen konnten nur die Maus-Isotypen IgG2a und IgG2b ähnliche Resultate wie der ursprüngliche mAk erzielen. Alle anderen Isotypen waren weniger wirksam. Diese Unterschiede wurden auf unterschiedliche Bindung an Fcγ-Rezeptoren erklärt (Hamaguchi et al., 2006; Uchida et al., 2004)

Zusammenfassend kann demnach festgehalten werden, dass eine mAk-vermittelte Zelldepletion von folgenden Faktoren abhängig ist: Das Vorhandensein des Zielmoleküls, d.h. zu welchem Zeitpunkt, auf welchen Zellen und in welchen Organen das Antigen exprimiert wird, ist dabei ebenso wichtig, wie die Eigenschaften des mAk. Sowohl der Isotyp, als auch die Zugänglichkeit des mAk zu den Zielzellen sind dabei ebenso zu berücksichtigen wie die Menge und die Häufigkeit der Applikation sowie die Zeitabhängigkeit der durch den mAk ausgelösten Reaktionen. Die verschiedenen Mechanismen sind von den entsprechenden Effektorzellen abhängig.

### **1.3 Mögliche Mechanismen der Zelldepletion**

#### **1.3.1 Komplementvermittelte Reaktionen**

Das Komplement-System ist Bestandteil der angeborenen Immunität, kann aber auch an Reaktionen der adaptiven Immunität beteiligt sein (Carroll and Fischer, 1997; Fischer et al., 1996). Als Komplement wird eine Gruppe von Serum-Proteinen bezeichnet, die an der Erkennung und Bekämpfung von Pathogenen (Mikroorganismen, Partikel) im Wirtsorganismus, aber auch der Beseitigung von toten, wirtseigenen Zellen beteiligt sind.

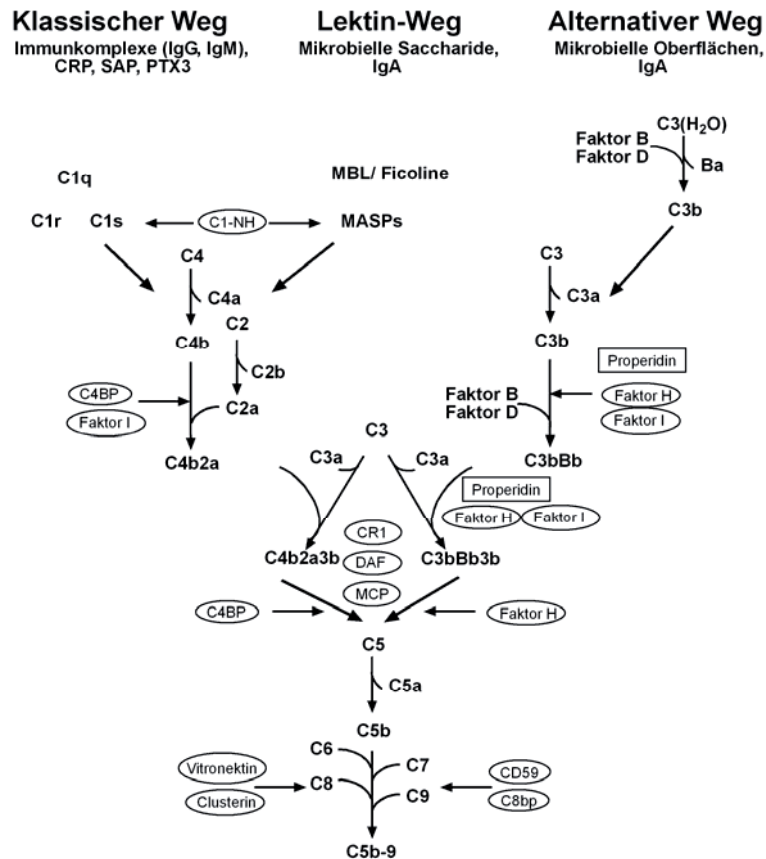
##### **1.3.1.1 Aktivierung von Komplement**

Bisher sind drei Wege bekannt, durch die das Komplement-System aktiviert werden kann, wobei immer eine C3-Konvertase gebildet wird, sodass die Spaltung von C3 den Schnittpunkt der unterschiedlichen Aktivierungswege darstellt (Abb. 1).

Der Klassische Weg ist durch die Bindung des C1q-Komplexes an die Pathogen- oder Zell-Oberfläche gekennzeichnet. Dies kann entweder direkt über die Bindung an Phosphocholin auf der Oberfläche, oder indirekt durch Bindung an C-reaktive Proteine oder Antigen-Antikörper-Komplexe auf der Oberfläche des Pathogens geschehen (Rawal and Pangburn, 2003). Die Oberflächenbindung des C1q-Komplexes bewirkt die autokatalytische Aktivierung des Komplexes, wodurch dieser wiederum zur Spaltung der nachfolgenden Komponenten C4 und C2 befähigt wird. Die Zusammenlagerung der beiden Spaltprodukte C4b und C2a auf der Pathogen-Oberfläche bildet dann die C3-Konvertase.

Im Lektin-Weg sind Kohlenhydrate die Strukturen auf der Pathogen-Oberfläche, an die die Bindung der Komplement-Proteine erfolgt. Die beiden häufigsten kohlenhydratbindenden Proteine sind das mannosebindende Lektin (MBL), und das an N-Acetylglucosamin bindende Ficolin. Lagert sich MBL mit den MBL-assoziierten Serin-Proteasen 1 und 2 (MASP-1/2) zusammen, werden analog zum Klassischen Weg C4 und C2 gespalten, woraufhin sich die C3-Konvertase C4bC2a bildet.

Während des Alternativen Weges läuft die erste Reaktion ohne vorherige Bindung an die Pathogen-Oberfläche ab. C3 zerfällt dabei spontan durch eine Hydrolyse und bildet C3H<sub>2</sub>O (entspricht C3b), das nun an die Pathogen-Oberfläche bindet und Plasma Protein Faktor B anlagert. Die C3-Konvertase C3bBb wird dann durch die Abspaltung von Ba durch die einzige bereits im Plasma aktive Protease, Faktor D, gebildet.



**Abb. 1** Überblick über die verschiedenen Möglichkeiten der Komplement-Aktivierung (aus Nauta 2004)

### 1.3.1.2 Wirkungsweise des Komplement-Systems

Nach der Zusammenlagerung der C3-Konvertasen sind die nachgeschalteten Reaktionen für alle drei Wege dieselben. C3 wird effektiv von den C3-Konvertasen in C3b und C3a gespalten. Von diesem Punkt aus gibt es zwei grundlegende Wirkungsweisen des Komplement-Systems, mit denen die erkannten Pathogene oder Zellen beseitigt werden. Die erste Möglichkeit ist die Phagozytose des Pathogens oder der Zelle durch Makrophagen und Neutrophile. Das Komplement erleichtert die Phagozytose zum einen dadurch, dass es die Pathogene opsoniert, das heißt mit den Komplement-Proteinen C3b und C4a bedeckt. Außerdem wirken C3a oder C5a als „Lockstoffe“, welche die Phagozyten an den Ort des Geschehens leiten und so Effektorzelle und Zielmolekül zusammenbringen. Phagozyten erkennen ihr Substrat über spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche, den Komplement-Rezeptoren (CR). Insgesamt gibt es 6 Typen von CR, u.a. CR1 (oder CD36), welches an C3b bindet, oder CR2/3/4, deren Ligand inhibiertes C3b (iC3b) ist. Die zweite Möglichkeit zur Pathogen-Bekämpfung ist die Ausbildung eines

Membran-Angriffskomplexes, der die Oberfläche des Pathogens direkt angreift. Dieser Komplex wird durch eine Folge von Polymerisierungsreaktionen ausgebildet und führt zum Verlust der Zell-Homöostase und letztlich zum Tod des Pathogens. Die Bildung des Komplexes wird durch die Bindung von C3b an die C3-Konvertase(n) initiiert, wodurch C5-Konvertasen gebildet werden (C3b<sub>2</sub>Bb oder C4bC2aC3b). Diese spalten nun C5, wobei C5b mit C6 und C7 einen Komplex bildet, welcher sich in die Membran des Pathogens einlagert. Daraufhin bindet der C8-Komplex und verursacht die Bildung einer C9-Polymer-Pore, die zum Verlust der Zellintegrität führt.

### 1.3.2 Fcγ-Rezeptoren

Fc-Rezeptoren sind Oberflächenproteine der Immunglobulin-Superfamilie, die den Fc-Teil eines Antikörpers binden und direkt in Immunantworten involviert sind (Nimmerjahn and Ravetch, 2008; Ravetch and Kinet, 1991). Basierend auf ihrer Immunglobulin-Spezifität werden folgende Fc-Rezeptoren unterschieden: Fcγ-Rezeptoren (IgG-bindend; FcγR), Fcε-Rezeptoren (IgE-bindend), Fcα-Rezeptoren (IgA-bindend), Fcμ-Rezeptoren (IgM-bindend) und Fcδ-Rezeptoren (IgD-bindend). Der neonatale Fcγ-Rezeptor (FcRn) ist für den Transport mütterlichen IgGs zum Fötus hin verantwortlich (Fridman, 1991).

Wie in Abb. 2 dargestellt ist, können in der Maus vier Klassen von FcγR unterschieden werden, deren Orthologe auch in anderen Säugetier-Spezies, u.a. dem Menschen, identifiziert wurden (Nimmerjahn and Ravetch, 2008).





mittelaффine FcγRIV. Im Menschen wurden darüber hinaus noch mehrere Varianten der FcγR II und –III identifiziert, wobei die FcγR IIA und C ebenfalls nur aus der α-Kette bestehen, die aber ein ITAM-Motiv enthält. Eine weitere Besonderheit des humanen FcγR-Systems ist die ausschließlich auf Neutrophile beschränkte Expression eines zusätzlichen Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-verankerten Rezeptors (FcγRIIIB). Der FcγRIV der Maus existiert im Menschen zwar nicht, ist strukturell und funktionell aber dem FcγRIIIA am ähnlichsten (Nimmerjahn et al., 2005).

FcγR finden sich auf fast allen Zellen des hämatopoetischen Systems. In den meisten Fällen exprimiert eine Zelle (Monozyten, Makrophagen, DZs, Mastzellen und Granulozyten) sowohl inhibierende als auch aktivierende FcγR, so dass die Expressionsniveaus der einzelnen Gruppen über das vermittelte Signal nach der Kreuzvernetzung durch Immunkomplexe entscheidet (Nimmerjahn and Ravetch, 2008). Ausnahmen bilden TZ, auf denen bisher keine FcγR nachgewiesen werden konnten, NK-Zellen, die einzig den aktivierenden Rezeptor FcγRIII exprimieren, und BZ, die nur über den inhibierenden FcγRII verfügen. Die Expression der aktivierenden Rezeptoren kann durch pro-inflammatorische Zytokine wie TNF-α und IFN-γ, Lipopolysaccharid (LPS, Endotoxin) oder die Komplement-Komponente C5a verstärkt werden. Interessanterweise können aktivierende FcγR aber auch an der Bildung von C5a beteiligt sein, wobei die Mechanismen noch völlig unklar sind (Nimmerjahn and Ravetch, 2008).

Die biologische Funktion der FcγR wurde bisher in vielen Studien untersucht (Nimmerjahn and Ravetch, 2008). So sind FcγR an der Phagozytose IgG-opsonierter Partikel oder Zellen beteiligt, vermitteln die Antikörper vermittelte zelluläre Zytotoxizität (*antibody dependend cellular cytotoxicity*, ADCC) durch NK-Zellen, induzieren Entzündungsreaktionen oder rufen Allergie über die Degranulierung von Mastzellen hervor (Ravetch and Clynes, 1998; Sanchez-Mejorada and Rosales, 1998). Für den inhibierenden Rezeptor FcγRIIB wurde über die Regulierung FcγR-vermittelter Immunantworten hinaus eine besondere Rolle in der BZ-Entwicklung nachgewiesen. So können niedrigaffine oder autoreaktive BZ, die entweder in ihrer frühen Entwicklung nicht deletiert wurden oder neu entstanden sind, zu einem späteren Zeitpunkt durch die Bindung der autoreaktiven Immunglobuline an den inhibierenden Rezeptor entfernt werden. Hierbei werden durch die isolierte Kreuzvernetzung von FcγRIIB apoptotische Prozesse induziert (Nimmerjahn and Ravetch, 2006). Die Bedeutung der FcγR zeigt sich



darin, dass das Fehlen einzelner Rezeptoren an der Entstehung von Autoimmunkrankheiten beteiligt ist (u.a. SLE, RA) (Siberil et al., 2007).

### 1.3.3 Apoptose

Apoptose bezeichnet den geregelten und geordneten physiologischen Tod von Zellen, welche entweder alt oder beschädigt sind, oder die während einer Immunantwort aktiviert wurden und nach dieser nicht mehr gebraucht werden (Choi et al., 2002). Typische Merkmale sind das Zusammenziehen und Kräuseln der Plasma- und Kernmembranen, die Fragmentierung der DNA, die Zerstörung des Zytoskeletts und die damit einhergehende Bildung von Apoptose-Körperchen, die von benachbarten Phagozyten aufgenommen werden. Nekrose hingegen ist ein passiver Prozess, der durch nichtphysiologische Stimulanzen wie Gifte, Pathogene, Radioaktivität und Mangel an Sauerstoff oder Nährstoffen ausgelöst werden kann. Im Gegensatz zur Nekrose führt Apoptose nicht zu Entzündungsreaktionen (Dhodapkar et al., 2008; Green et al., 2009).

Krammer et al. (2007) unterscheiden für aktivierte TZ in der Peripherie grundsätzlich zwei Arten von Zelltod. Der autonome Tod einer aktivierten Zelle (*activated cell-autonomous death*, ACAD) steht für den Tod nach Zytokin-Entzug oder durch das Ausbleiben von Überlebenssignalen. Der aktivierungsinduzierte Zelltod (*activation-induced cell death*, ACID) wird ausgelöst, wenn bereits aktivierte und expandierte TZ erneut über den TZR stimuliert werden, kostimulatorische Signale aber ausbleiben. Beide Arten des Zelltodes können sowohl über Caspase-abhängige als auch über Caspase-unabhängige Apoptose-Mechanismen realisiert werden. Innerhalb der Caspase-abhängigen Mechanismen können noch einmal Zelltod-Rezeptor-abhängige (extrinsische) Mechanismen und Mitochondrien-abhängige (intrinsische) Mechanismen unterschieden werden. Der Caspase-unabhängige Mechanismus kann beispielsweise durch die Aktivierung von Kathepsinen (Lysozym-lokalisierte Proteasen) oder Granzym B ausgelöst werden.

Die im Gegensatz zu Kathepsinen weitaus häufiger vorkommenden zelltodassoziierten Proteasen sind Caspasen, welche im Zytosol lokalisiert sind und in zwei Gruppen eingeteilt werden können. Die Initial-Caspasen 8, 9, 10 und 2 verfügen über eine Todes-Domäne und werden durch bestimmte Stimuli über Bildung eines großen Initiierungs-

Protein-Komplexes aktiviert. Erst nach Aktivierung (Autoproteolyse) innerhalb dieses Komplexes können die Initial-Caspasen dann die Effektor-Caspasen 3, 6, 7 durch Spaltung aktivieren. Diese wiederum spalten zelluläre Proteine wie Aktin, Plektin oder Gelsolin, die die Zerstörung der DNA und der Zellstruktur, sowie die Expression von Erkennungssignalen (z.B. Phosphatidylserin) für die Phagozytose bewirken (Green et al., 2009).

### 1.3.3.1 Extrinsische Apoptose

Die extrinsische Apoptose ist durch Signale der Zelltod-Rezeptoren auf der Zelloberfläche nach Bindung des Liganden auf der Nachbarzelle oder derselben Zelle charakterisiert. Zu diesen Rezeptoren gehören TNF-Rezeptor1 (TNFR1), CD95 (FAS), TRAIL-Rezeptor1/2 und die Todes-Rezeptoren 3 und 6. Die durch diese Rezeptoren vermittelten Signale bewirken die Bildung eines totinduzierenden Komplexes (*Death-inducing signalling complex*, DISC), in dem dann die Initial-Caspasen aktiviert werden. Für CD95-vermittelte Apoptose sind zwei Signalwege beschrieben worden. Lymphozyten werden als Typ I-Zellen bezeichnet (Jost et al., 2009), welche große Mengen CD95-DISC bilden. Dies resultiert in der Bildung großer Mengen aktiver Caspasen 8 und 10, welche direkt die Effektor-Caspasen aktivieren. Typ II-Zellen wie Hepatozyten und Pankreas-β-Zellen (Jost et al., 2009) benötigen eine Verstärkung der Caspase-Aktivität über die zusätzliche Aktivierung von Caspase 9, welche dann zur Aktivierung der Effektor-Caspasen beiträgt.

### 1.3.3.2 Intrinsische Apoptose

Beim intrinsischen Zelltod resultiert die Aktivierung der Caspasen nicht aus Signalen der Zell-Tod-Rezeptoren sondern aus Stimuli über den TZR, ultravioletter Strahlung, DNA-Schädigung, Stress des Endoplasmatischen Retikulums, Hormone (z.B. Glukokortikoide) oder Zytokin-Entzug (Willis et al., 2007). Diese Signale führen zur Aktivierung des BZ-Lymphoma 2 interagierenden Zelltod-Mediators (*B cell lymphoma 2 interacting mediator of cell death*, BIM) und des p53-hochregulierten Apoptose-Modulators (*p53-upregulated mediator of apoptosis*, PUMA) (Willis et al., 2005), welche wiederum die anti-apoptotischen BCL-2-Proteine an der äußeren Mitochondrienmembran angreifen. Die anti-apoptotische Wirkung der BCL-2-Proteine äußert sich darin, dass sie die pro-

apoptotischen, Mitochondrien assoziierten Proteine BAX und BAK (Broome et al., 1995) in einem inaktiven Zustand halten. BAX und BAK zerstören die äußere Mitochondrienmembran, was dann zur Freisetzung von Cytochrom c, der Bildung des Apoptosoms und der Aktivierung von Caspase 9 und schließlich der Effektor-Caspasen führt (Chipuk et al., 2008).

### 1.4 Aufgabenstellung

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, grundlegende Mechanismen Antikörper-vermittelter T-Zelldepletion in der Maus zu identifizieren. Die folgenden Aufgabenbereiche wurden dazu festgelegt:

- 1) Modifizierung eines etablierten Modells der CD4<sup>+</sup>T-Zelldepletion (CD4 TZD) in der Maus. Hierbei sollten ein geeignetes Behandlungsprotokoll und Parameter der Analyse sowie der Auswertung bestimmt werden.
- 2) Identifizierung grundlegender Effektormechanismen der CD4 TZD. Außerdem sollten die beteiligten Effektorzellen bestimmt und charakterisiert werden.
- 3) Überprüfung, inwieweit die Mechanismen der CD4 TZD auf die Depletion von ICOS<sup>+</sup> TZ übertragbar sind. Hierzu sollten ICOS-spezifische Antikörper charakterisiert und in einem geeigneten *in vivo*-Modell auf ihre Depletionskapazität im Vergleich zum anti-CD4 mAk YTS191.1 getestet werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Chemikalien und Materialien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den folgenden Firmen bezogen: Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Merck Chemicals (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Steriles Plastikeinwegmaterial wurde von den Firmen Greiner GmbH (Frickenhausen), Nunc (Roskilde, Dänemark) oder Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

### 2.2 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.1 Puffer

PBS	136,89 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 1,47 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8,05 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,3
FACS-PBS	PBS + 2,5 % FCS + 0,1 % $\text{NaN}_3$
MACS-PBS	PBS + 0,5 % BSA (Fraktion V, Endotoxingehalt <1 EU/mg, PAA Laboratories GmbH, Cölbe)

#### 2.2.2 Zellkulturmedien

Das RPMI 1640 (Biochrom AG, Berlin) Medium für die Kultivierung muriner Zellen wurde mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS, Biochrom), 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin (Invitrogen), 50 µM  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME, Merck), 1 mM nicht-essentiellen Aminosäuren und 1 mM Natrium-Pyruvat (Invitrogen, AS/Pyr) komplettiert. Das FCS wurde vor Verwendung für 45 min bei 56 °C hitzeinaktiviert.

### 2.2.3 Isolierung muriner Zellen

Zur Isolierung von Zellen aus Milz, Lymphknoten (Lk), Thymus und Peyer-Plaques wurden die Organe zerschnitten und durch ein 212  $\mu\text{m}$  bzw. 70  $\mu\text{m}$  Sieb passiert. Milzzellen wurden zusätzlich einer 1-minütigen Erythrozytenlyse mit ACK-Puffer (0,15 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mM  $\text{KHCO}_3$ , 0,1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) unterzogen. Die Zellen wurden erneut über 70  $\mu\text{m}$  Nylon-Zell-Siebe gegeben und entsprechend der weiteren Verwendung in FACS-PBS, MACS-PBS oder Zellkulturmedium aufgenommen. Die Zellzahl wurde mit Hilfe des Zellzählgerätes Guava<sup>®</sup>PCA (Guava Technologies) ermittelt. Die Zellen wurden in dem Viacount Reagenz (2,5  $\mu\text{g/ml}$  LDS-751, 1  $\mu\text{g/ml}$  Propidiumiodid, 5 mM EDTA, 0,05 %  $\text{NaN}_3$ , in PBS, pH 7,2) verdünnt und für 5 min inkubiert. Die Berechnung der Anzahl nukleärer und lebender Zellen erfolgte mit der ViaCount Software (Guava Technologies).

### 2.2.4 Anreicherung von TZ mittels Nylonwolle

Für die Anreicherung von TZ aus der Milz wurde die Zellsuspension nach der Erythrozytenlyse auf Nylonwoll-Säulen (Eisen et al., 1972) aufgetragen. Die Säulen bestanden aus 50 ml Plastikspritzen (BD, Bedford USA), die mit 3 mg gewaschener (0,1 M  $\text{HCl}$ , gespült mit Wasser), getrockneter und mit Bürsten aufgelockerter Nylonwolle (PolySciences *nylon wool fibre*) befüllt wurden. An die Spritze wurde ein 2-Wege Sperrhahn angebracht. Vor dem Auftragen der Zellen wurde die Nylonwoll-Säule mit PBS gespült und mit vorgewärmtem  $\text{R10F}^+/\beta\text{-ME}$  äquilibriert. Bis zu  $600 \times 10^6$  Splenozyten wurden in Medium auf eine Säule gegeben und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 90 ml, 37 °C warmen  $\text{R10F}^+/\beta\text{-ME}$  unter Verwendung einer stumpfen 21 G Kanüle (Braun) eluiert. Die Anreicherung der TZ betrug meist 60-70 %.

### 2.2.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit, die Expression von Proteinen auf Einzelzellebene zu analysieren (Radbruch, 2000). Sowohl oberflächenexprimierte als auch intrazelluläre Proteine können so mit fluoreszenzmarkierten mAk untersucht werden (Sander et al., 1991).

### 2.2.5.1 Verwendete Fluorochrome

**Tab. 1: Übersicht der verwendeten Fluorochrome**

Fluorochrom	Anregungs- wellenlänge (nm)	Emissions- maximum (nm)	BP Filter (LSRII)	Filter (FACSCalibur)
FITC, CFSE	488	525	530/30	BP 530/30
PE	488	575	585/42	BP 585/42
PI	488	620		LP $\geq$ 670
PE-Cy7	488	767	780/60	
A647/Cy5/APC	633	665/667/660	670/14	BP 661/16
A700	633	723	720/30	
APC-Cy7	633	767	780/60	
APC-A750	633	779	780/60	
Pacific Blue/DAPI	405	451/460	440/40	
Cascade Yellow/ DAPI	405	558/460	562/40	
Pacific Orange	405	551	562/40	

Angabe der Wellenlänge des Lasers zur Anregung der Fluorochrome, sowie die zur Detektion im jeweiligen Durchflusszytometer (LSRII, ARIAI und FACSCalibur, BD) verwendeten Filter. Abk.: BP: Bandpassfilter, LP: Langpassfilter. Emissionsmaxima wurden zusammengestellt mit Daten von BD Biosciences, Zeiss und Molecular Probes.

### 2.2.5.2 Verwendete Antikörper (mAk)

**Tab. 2: Übersicht über die verwendeten mAk**

Antigen	Klon	Quelle	Referenz/Hersteller
CD3	KT3	Hybridom	(Tomonari, 1988)
CD4	GK1.5	Hybridom	ATCC: TIB 207
CD4	YTS 191.1	Hybridom	ECACC:87072282
CD8	53-6.72	Hybridom	ATCC: TIB 105
CD11b	5c6	Hybridom	ATCC: CRL-1969
CD11c	N418	Hybridom	ATCC: HB-224
CD19	1D3	Hybridom	ATCC: HB-305
CD25	2E4	Hybridom	(Ortega et al., 1984)
CD44	IM7.8.1	Hybridom	ATCC: TIB 235
CD45R (B220)	RA3-6B2	Hybridom	(Coffman, 1982)
CD62L	MEL-14	Hybridom	ATCC: HB-132

CD90.1 (Thy-1.1)	OX-7	Hybridom	ECACC: 84112008
CD95 (Fas)	15A7	kommerziell	eBioscience
CD278 (ICOS)	MIC 2043	Hybridom	(Burmeister et al., 2008)
CD278 (ICOS)	MIC 108	Hybridom	AG KroczeK, unveröffentlicht
CD278 (ICOS)	MIC 369	Hybridom	AG KroczeK, unveröffentlicht
CD278 (ICOS)	MIC 1096	Hybridom	AG KroczeK, unveröffentlicht
CD278 (ICOS)	MIC 1136	Hybridom	AG KroczeK, unveröffentlicht
CD278 (ICOS)	MIC 1139	Hybridom	AG KroczeK, unveröffentlicht
CD278 (ICOS)	MIC 1221	Hybridom	AG KroczeK, unveröffentlicht
CD278 (ICOS)	MIC 1632	Hybridom	AG KroczeK, unveröffentlicht
CD278 (ICOS)	MIC 2441	Hybridom	AG KroczeK, unveröffentlicht
FoxP3	FJK-16s	kommerziell	eBioscience
Ly-6G/C	RB6-8C5	Hybridom	(Hestdal et al., 1991)
MHCII	M5/114.15.2	Hybridom	ATCC: TIB 120
V $\alpha$ 2-TCR	B20.1	kommerziell	eBioscience
V $\beta$ 5-TCR	MR9-4	kommerziell	BD Biosciences
CD169 (Siglec-1)	7-239	kommerziell	Serotec
CD209b	ER-TR9	kommerziell	abcam
CD16-2 (Fc $\gamma$ RIV)	MB1-9E9	Kooperation	(Nimmerjahn et al., 2005)
Ly-6G	1A8	kommerziell	BD Biosciences
Ly-6C	AL-21	kommerziell	BD Biosciences
F4/80	F4/80	Hybridom	(Austyn and Gordon, 1981)
F4/80	BM8	kommerziell	eBioscience
a-Dig	Schaf-anti-Digoxigenin	kommerziell	Roche
polyklonales Ig	arm. Hamster	kommerziell	eBioscience
Iso mu IgG2a	S43-10	Hybridom	(Reth et al., 1978)

Auflistung aller verwendeten mAk. Die nicht kommerziell bezogenen Ak stammen aus laboreigenem Hybridomüberstand und wurden an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt. Einige mAk stammen aus Kooperationen.

### 2.2.5.3 Kopplung von Antikörpern an Haptene oder Fluorochrome

Ungekoppelte kommerzielle und andere laboreigene Antikörper (Tab. 2) wurden nach Standardmethoden an Haptene (Digoxigenin, Biotin) oder Fluorochrome gekoppelt (Brinkley, 1992; Goding, 1996; Oi et al., 1982).

#### 2.2.5.4 Oberflächenfärbung

Abhängig von der Größe der zu untersuchenden Zellpopulation wurden  $0,3\text{--}4 \times 10^6$  Zellen in einer 96er-Rundbodenplatte (Nunc) eingesetzt. Um unspezifische Antikörperbindungen an Fc-Rezeptoren zu minimieren, wurden die Zellen vor der Antikörperinkubation 5 min auf Eis mit  $1 \times \text{Fc-Block}$  ( $100 \mu\text{g/ml}$  anti-CD16/CD32 (Klon 2.4G2)) inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit in FACS-PBS verdünnten Antikörpern (Tab. 1) für 20 min auf Eis. Es wurden sowohl direkt an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelte als auch Biotin- und Dig gekoppelte mAk verwendet. Die Biotin-gekoppelten bzw. Dig-gekoppelten Primäantikörper wurden mit fluoreszenzfarbstoffgekoppelem Streptavidin bzw. anti-Dig Antikörper angefärbt (5 min bzw. 20 min auf Eis). Ungekoppelter Antikörper oder anti-CD4-Magnetpartikel wurden mit Ziege-anti-Ratte-IgG Fc $\gamma$ -spezifischem-Cy5 Sekundärreagenz (Dianova) detektiert. Sämtliche Antikörper wurden vor ihrer Verwendung titriert, um optimale Färbeergebnisse zu erhalten. Zur Identifizierung von toten Zellen wurden kurz vor der Messung im Durchflusszytometer die DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffe Propidiumiodid ( $0,33 \mu\text{g/ml}$ ; PI; für FACSCalibur) oder 4', 6-Diamidino-2-Phenylindol ( $0,33 \mu\text{g/ml}$ , DAPI; Roche) zugesetzt. Die intakte Zellmembran lebender Zellen verhindert das Eindringen dieser Farbstoffe. Die PI<sup>+</sup>- oder DAPI<sup>+</sup>-Zellen wurden in der Auswertung der Daten ausgeschlossen.

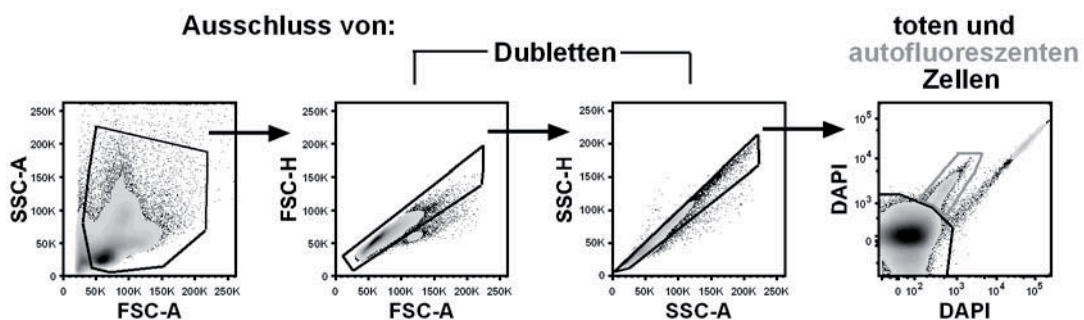
#### 2.2.5.5 Intrazelluläre Färbung

Für die intrazelluläre Färbung von Proteinen wurden Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 % Formaldehyd in PBS fixiert (20 min, RT). Danach wurden die Zellen in FACS-PBS gewaschen und bis zur Färbung in FACS-PBS bei 4 °C gelagert. Alle folgenden Waschschrte und Antikörperinkubationen erfolgten in 0,5 % Saponin in FACS-PBS, um die Zellmembran zu permeabilisieren. Für die Färbung von FoxP3 wurde das *FoxP3 Staining Buffer Set* (eBioscience) verwendet. Die Oberflächenfärbungen und die Anfärbung toter Zellen mit dem *Pacific Orange Live/Dead Stain* (Invitrogen) erfolgten generell vor der Fixierung.



### 2.2.5.6 Messung und Auswertung

Die Analyse der gefärbten Zellen erfolgte am LSRII-Durchflusszytometer unter Verwendung der Software BD FACSDiva oder am FACSCalibur mit der Aufnahme-Software CellQuest Pro (Geräte und Software von BD Biosciences). Zur Auswertung der Daten wurde die Software FlowJo (Tree Star Inc.) verwendet. Die Ergebnisse wurden als Histogramm oder **Dot Plot dargestellt**, wobei die Zahlen (wenn vorhanden) den prozentualen Anteil der eingegrenzten Zellen angeben. Die standardmäßig durchgeführte Analysestrategie ist in Abb. 3 gezeigt. Es wurde eine geeignete Eingrenzung der Zellen im Vorwärts (FSC)- und Seitwärtsscatter (SSC) als auch ein Ausschluss der toten Zellen über PI bzw. DAPI vorgenommen. Bei allen am LSRII gemessenen Proben wurden zusätzlich Zelldubletten, deren Größe bezüglich der Höhe (-H) und Fläche (-A) der Seitwärts- und Vorwärtsscattersignale nicht proportional zunahm, für die weitere Analyse ausgeschlossen. Autofluoreszente Zellen wurden für Analysen von Makrophagen- Populationen einbezogen, sonst ausgeschlossen.



**Abb. 3** Durchflusszytometrische Analyse

Die Zellen wurden nach ihren Größeneigenschaften im Vorwärts- und Seitwärtsscatter eingegrenzt. In dieser Arbeit wurden sowohl Granulozyten und Makrophagen als auch Lymphozyten betrachtet, weshalb die Eingrenzung im Scatter groß gewählt wurde. Zelldubletten und tote (DAPI<sup>+</sup>) Zellen wurden aus der Analyse ausgeschlossen. DAPI wurde sowohl über die Detektoren für Pacific Blue (PacB) als auch Pacific Orange (PacO) detektiert. Autofluoreszente Zellen wurden nur für die Analyse von Makrophagen einbezogen.

### 2.2.6 Magnetische Sortierung

Mit Hilfe der magnetischen Sortierung (*Magnetic Activated Cell Sort*, MACS) können Zellen aus einer komplexen Zellsuspension separiert werden. Die Sortierung erfolgt über

die Bindung von Oberflächenantigen-spezifischen Antikörpern an ihre Zielstrukturen und die Trennung über magnetisierbare Säulen in einem Magnetfeld. Die mAk sind entweder direkt oder über Sekundärreagenzien an paramagnetische Partikel gekoppelt. Die unmarkierten Zellen fließen durch die Säulen im Magnetfeld durch, während die Zellen, welche Magnetpartikel gebunden haben, auf der Säule verbleiben. Nach Entfernen der Säule aus dem Magneten können auch diese Zellen eluiert werden (Miltenyi et al., 1990). Die zu isolierende Population kann entweder direkt (positiv) oder indirekt über Depletion der unerwünschten Zellen (negativ) sortiert werden.

FcγRIV<sup>+</sup> Zellen wurden positiv aus einer Milzzellsuspension isoliert. Die Sortierung von CD4<sup>+</sup> TZ aus Milzzellsuspension oder aus über Nylonwolle angereicherte T-Zellen (Kap 1.4.4) erfolgte durch Depletion von CD11c<sup>+</sup>, NK1.1<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, Ly6G/C<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen. Die Zellen wurden bei einer Zelldichte von  $1 \times 10^8$  Zellen/ml mit biotinylierten oder Dig-gekoppelten mAk (Tab. 2) in der optimalen Verdünnung in MACS-PBS für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend mit anti-Biotin MicroBeads oder anti-Dig MicroBeads (Miltenyi Biotec) versetzt. Alle Inkubationen mit Magnetpartikeln erfolgten mit  $2 \times 10^8$  Zellen/ml für 15 min bei 4 °C. Die Zellen wurden dann über die LS-Säulen im Magneten (MidiMACS®, Miltenyi Biotec) separiert. Während der negativen Zellsortierungen wurde die Tropfgeschwindigkeit durch Verwendung einer 22 G-Kanüle (Braun) an der Säule eingestellt. Die Äquilibration, der Probenaufrag und die Elution erfolgten nach Angaben des Herstellers (Miltenyi Biotec). Die Reinheit der sortierten Population wurde durchflusszytometrisch überprüft. FcγRIV<sup>+</sup> Zellen konnten mit einer Reinheit von 90 % sortiert werden. Die Reinheit von CD4<sup>+</sup> TZ lag meist bei 85–90 %, weil CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> Zellen (doppelt negativ) auf diese Weise nicht depletiert werden können.

### **2.2.7 Durchflusszytometrische Sortierung**

Die positive magnetische Sortierung von kleinen Populationen ist durch die hohe Bindekapazität der Säulen begrenzt. Um eine Säule spezifisch mit den Zielzellen zu beladen, wären hohe Mengen an Ausgangszellen nötig. Zudem können bei einer positiven Sortierung tote Zellen unspezifisch auf der Säule verbleiben und damit die sortierte Fraktion verunreinigen. Die durchflusszytometrische Sortierung an einem BD FACS Aria™ Hochgeschwindigkeits-Zellsortiersystem (BD Biosciences) ermöglicht

dagegen die Isolierung kleiner Subpopulationen (1–2 %) mit sehr hoher Reinheit, da eine genaue Eingrenzung der Zielzellen und der Ausschluss von toten Zellen vorgenommen werden kann. Außerdem gibt es keine Limitation durch die Zellzahl sondern höchstens durch die Dauer der Sortierung.

Zur Sortierung von FcγRIV<sup>+</sup> Zellen wurde Milzzellsuspension ( $1 \times 10^8$  Zellen/ml in MACS-PBS) mit folgenden mAk gefärbt: anti-CD3-PacB, anti-CD19-PacB, anti-FcγRIV-Dig und anti-Dig-A647 (siehe Tab. 2). Für die Sortierung von F4/80-exprimierenden Populationen wurde mit anti-CD3-PacB, anti-CD19-PacB, anti-F4/80-bio und SA-PE oder SA-APC gefärbt. Zur Detektion toter Zellen wurde DAPI zugesetzt. Sortiert wurde unter Verwendung der 70 µm-Nozzle. Die benutzten Laser und Filtersysteme ähneln denen des BD™ LSR II.

## **2.2.8 Markierung von Zellen**

### **2.2.8.1 CFSE**

Für die durchflusszytometrische und immunohistochemische Detektion von Zellen nach den Transfer in Rezipiententiere wurden die zu transferierenden Zellen mit CFSE (Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester, Molecular Probes) markiert. CFSE ist ein fluoreszierender Farbstoff, der in die Zelle eindringen kann. Dort werden die lipophilen Gruppen des Moleküls durch unspezifische Esterasen abgespalten, weshalb der Farbstoff in der Zelle verbleibt. Die Markierung der Zellen erfolgte je nach Fragestellung in einer 5 µM oder 25 µM CFSE-Lösung ( $5 \times 10^7$  Zellen/ml in PBS + 0,1 % BSA) für 10 min bei 37 °C.

### **2.2.8.2 Magnetische Partikel**

Magnetische Partikel haben im Vergleich zu CFSE oder anderen Farbstoffen den Vorteil, dass sie in der Zelle nicht so schnell abgebaut werden. Außerdem bietet die Verwendung dieser Partikel die Möglichkeit, alternative Methoden der Analyse zu nutzen. In der Elektronenmikroskopie sind Magnetpartikel gut detektierbar und in der Immunohistochemie können die Partikel mit geeigneten Methoden (siehe 2.8.5) noch dann nachgewiesen werden, wenn die Fluoreszenz von Farbstoffen schon verblichen ist.

Ein Nachteil der Nutzung magnetischer Partikel für die Markierung von Zellen ist die potenzielle Toxizität bei zu hoher Dosierung der eisenhaltigen Partikel. In der vorliegenden Arbeit wurden die transferierten  $CD4^+$  TZ mit einer doppelt so hohen Menge von anti-CD4 mAk-gekoppelten Magnetpartikeln inkubiert wie im Herstellerprotokoll für eine Magnetische Sortierung empfohlen (Miltenyi). Die erhöhte Magnetpartikelzahl sollte die spätere Detektion der beladenen Zellen sicherstellen. Die Inkubation mit den Partikeln erfolgte immer in  $R10F^+\beta$ -ME-Medium. Wurden die  $CD4^+$  TZ anschließend transferiert, wurde eine Stunde bei 37 °C mit den Magnetpartikeln inkubiert und nach zweimaligem Waschen in die Rezipiententiere injiziert. Für die Analyse der Modulation des CD4-Oberflächenmoleküls *in vitro* wurden die Inkubationszeiten mit sortierten  $CD4^+$  TZ oder Gesamtmilzzellen je nach Fragestellung variiert.

### 2.3 Mäuse

Fc $\gamma$ R-defiziente, Fc $\gamma$ RI-defiziente, Fc $\gamma$ RII-defiziente, Fc $\gamma$ RIII-defiziente, Fc $\gamma$ RI/III-doppel defiziente und C3-defiziente Tiere erhielten wir im Rahmen einer Kooperation von der AG Gessner (Medical School Hannover). Fc $\gamma$ R-defiziente Mäuse (Takai et al., 1994) und Fc $\gamma$ RII-defiziente Tiere (Takai et al., 1996) wurden über 12 Generationen auf den C57BL/6-Hintergrund rückgekreuzt. Fc $\gamma$ RI-defiziente Mäuse (Ioan-Facsinay et al., 2002) blieben auf BALB/c-Hintergrund. Fc $\gamma$ RIII-defiziente Tiere (Hazenbos et al., 1996) wurden über 8 Generationen auf den C57BL/6 Hintergrund rückgekreuzt. Fc $\gamma$ RI/III wurden in der AG Gessner gezüchtet und über 4 Generationen auf den C57BL/6 Hintergrund rückgekreuzt. C3-defiziente Tiere (Pekna et al., 1998) wurden über 13 Generationen auf den C57BL/6 Hintergrund rückgekreuzt. OT-II Tiere mit dem transgenen, für Ovalbumin (OVA) spezifischen TZR  $V\alpha 2/V\beta 5$  (Barnden et al., 1998) wurden zusätzlich mit B6.PL Mäusen (Jackson) gekreuzt, um adoptiv transferierte Zellen über den Marker CD90.1 (Thy-1.1) nachverfolgen zu können. Als Wildtyp (wt) Kontrolltiere für alle Experimente wurden C57BL/6 bzw. BALB/c-Tiere ähnlichen Alters verwendet. Die Zucht und Haltung der Tiere erfolgte unter spezifisch-pathogen-freien Bedingungen im Tierbereich des Bundesinstituts für Risikobewertung, Berlin.

## 2.4 Adoptiver Transfer von Zellen und Immunisierung

Für alle Antigen-spezifischen Transferexperimente wurden Milzzellen von OVA-TZR-transgenen OT-II Mäusen isoliert. Die Frequenz der TZ mit dem transgenen V $\alpha$ 2/V $\beta$ 5-TZR wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Milzzellen, welche  $2,7 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup>Thy-1.1<sup>+</sup>V $\alpha$ 2<sup>+</sup>V $\beta$ 5<sup>+</sup> Zellen enthielten, wurden intravenös (i.v.) in die wt Rezipiententiere injiziert. Die Mäuse wurden 18–24 h nach dem Transfer einmalig systemisch mit 2 mg endotoxinfreiem OVA (< 5 pg/mg gemäß LAL Assay) und 10  $\mu$ g LPS i.v. immunisiert. Diese Aktivierung der Zellen induziert die Expression verschiedener aktivierungsabhängiger Oberflächenmoleküle zu denen auch ICOS gehört (Hutloff et al., 1999).

## 2.5 Depletion von Zellen in vivo

### 2.5.1 Depletionsprotokoll

Um die optimale Dosis des anti-CD4 mAk YTS191.1 (endotoxinfrei) zu bestimmen, wurden 50, 100 oder 200  $\mu$ g mAk in insgesamt 250  $\mu$ l PBS durch intraperitoneale (i.p.) Gabe verabreicht. Kontrolltiere erhielten PBS. In allen weiteren Depletionsexperimenten wurden 100  $\mu$ g mAk appliziert. Je nach Fragestellung wurde der mAk einmalig oder nach 24 h erneut gegeben. Die Analyse der Depletion erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten nach mAk-Gabe. Je nach Fragestellung wurden Milz, Thymus, Peyer-Plaques und Lk (mandibulär, popliteal, axillär, inguinal, mesenterisch) entnommen und analysiert.

### 2.5.2 Analyse der CD4<sup>+</sup> T-Zelldepletion (CD4 TZD)

Um die Expression von CD4 trotz Bindung von YTS191.1 (*in vivo* injiziert) nachweisen zu können, wurde in *ex vivo* Analysen ein zweiter anti-CD4 mAk GK1.5 verwendet. Wie in Kapitel 1 gezeigt wird, war die Detektion von CD4 über GK1.5 trotz Bindung von YTS191.1 unterhalb einer Konzentration von 15  $\mu$ g/ml YTS191.1 möglich.

Da sich durch die Depletion von CD4<sup>+</sup> TZ die absolute Gesamtzellzahl des untersuchten Organs deutlich verringerte, wurden CD19<sup>+</sup> Zellen als konstante Referenzpopulation definiert. Die Änderung der Frequenz dieser Population im Vergleich zur Kontrolle wurde zur Berechnung des Faktors x herangezogen, mit dem die gemessene Zielzell-Frequenz korrigiert wurde. Weil CD4 auf der Zelloberfläche nach anti-CD4 mAk-Gabe moduliert wird (siehe Kapitel 3.1.3), wurden CD4<sup>+</sup> TZ als CD19<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> Zellen definiert und werden im Folgenden nur noch als CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> Zellen bezeichnet. Die Depletion wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Depletion (\%)} = 100 - \left[ 100 * \frac{\frac{\text{CD3}^+\text{CD8}^- \text{ Depl.}}{x}}{\text{CD3}^+\text{CD8}^- \text{ Kontr.}} \right] \quad \text{mit } x = \frac{\text{CD19}^+ \text{ Depl.}}{\text{CD19}^+ \text{ Kontr.}}$$

Für die eingesetzten Kontrollwerte wurde jeweils der Mittelwert aller Kontrolltiere verwendet.

## 2.6 Inhibition von Caspase-Aktivität

Um die Beteiligung von Caspase-abhängiger Apoptose an der Depletion von CD4<sup>+</sup> TZ zu untersuchen, wurde der Pan-Caspase-Inhibitor Q-VD-OPH (Quinolyl-valyl-O-methylaspartyl-[-2,6-difluorophenoxy]-methyl ketone; R&D Systems) verwendet. Dieser inhibiert irreversibel die Caspasen 9,3,8,10,12 (Caserta et al., 2003). Je 0,4 mg des Inhibitors in 15 % DMSO (ACS-Reinheitsgrad, verdünnt mit PBS) wurden 2 h vor und 24 h nach Applikation des depletierenden mAk YTS191.1 (oder PBS) i.p. verabreicht. Kontrolltiere erhielten das Lösungsmittel. Die Analyse der Organe erfolgte 48 h nach mAk-Gabe.

## 2.7 Elektronenmikroskopie

Für die Analyse von Zellen, welche mit Magnetpartikeln markiert waren, wurden elektronenmikroskopische Methoden verwendet. Die Durchführung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen und Elementaranalysen der in dieser Arbeit generierten

Proben (Magnetpartikel, Zellsuspensionen) am Transmissions-Elektronenmikroskop erfolgte durch Dr. Michael Laue in der Abteilung ZBS4 des Robert Koch Instituts in Berlin.

## **2.8 Immunohistochemie (IHC)**

### **2.8.1 Präparation von Kryoschnitten**

Zur Kryokonservierung wurden die Gewebe direkt nach der Entnahme in 0,9 % NaCl in flüssigem Stickstoff eingefroren. Lk und Peyer-Plaques wurden mit TissueTek (Electron Microscopy Sciences, Washington, DC, USA) auf einer Aluminiumfolie überschichtet und eingefroren. Lungen wurden über die Trachea mit 50 % TissueTek in PBS perfundiert, entnommen und ebenfalls mit TissueTek überschichtet eingefroren. Die Lagerung der entnommenen Gewebe erfolgte bei  $-70^{\circ}\text{C}$ . Am Kryostat 2800 (Frigocut N, Reichert-Jung, Wien) wurden  $8\text{ }\mu\text{m}$  Kryoschnitte angefertigt, die auf silanisierte Objektträger aufgezogen und über Nacht bei RT getrocknet wurden.

### **2.8.2 Präparation von Zytospins**

Unfraktionierte Milzzellen (mit und ohne Erythrozytenlyse) oder sortierte Zellfraktionen wurden in einer Dichte von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml auf silanisierte Objektträger aufgebracht. Die Präparationskammer bestand aus dem Objektträger, der mit einer zwei-löchrigen Filterkarte bedeckt war. Auf die Filterkarte wurde der Zelltrichter gesetzt und alles zusammen in Stahlklammern eingespannt. Die Materialien stammen alle von Shandon (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Germany). Die Zellsuspension ( $100\text{--}150\text{ }\mu\text{l}$ ) wurde in den Trichter gegeben und in der Shandon Cytospin3-Zentrifuge bei 800 rpm für 10 min zentrifugiert. Die Objektträger wurden über Nacht bei RT getrocknet.

### **2.8.3 Fixierung**

Für die Färbung von Oberflächenantigenen erfolgte die Fixierung der Kryoschnitte und Zytospins in Azeton für 10 min. Objektträger, die nicht sofort für eine Färbung



herangezogen wurden, wurden bei -70 °C gelagert und bei späterem Gebrauch nach dem Auftauen erneut in Azeton fixiert. Die Proben wurden vor Beginn der Färbeprozedur mit einem Fettstift umrandet, um das Ineinanderlaufen von Antikörper-Lösungen benachbarter Proben zu verhindern.

### **2.8.4 Immunohistochemische Färbung**

In der vorliegenden Arbeit wurden gebundene Antikörper über Meerrettich-Peroxidase (*horsereddish peroxidase*, POD) detektiert. Zuvor wurde die endogene Peroxidaseaktivität, (u.a. in Granulozyten, Mastzellen und Erythrozyten) durch Inkubation in Peroxidase-Blocklösung in einer Küvette für 1 h bei 37 °C inhibiert. Alle folgenden Inkubationen erfolgten in einer Feucht-Kammer. Zwischen den Antikörper-Inkubationen wurde jeweils dreimal für 5 min in einer Küvette mit Waschpuffer und einmal kurz mit PBS gewaschen. Vor der Inkubation mit Antikörpern wurden durch NEN-Blocklösung (siehe unten) unspezifische Bindungsstellen auf den Gewebeschnitten abgesättigt. Die Inkubation mit den FITC-, Biotin- oder Digoxigenin-gekoppelten Primärantikörpern erfolgte in NEN-Blocklösung über Nacht bei 4 °C. Sämtliche Antikörper wurden vor ihrer Verwendung titriert, um optimale Färbeergebnisse zu erhalten. Für die Detektion der Primärantikörper wurden Schaf-anti-FITC-POD, Schaf-anti-Biotin bzw. Schaf-anti-Dig-POD (alle Roche) verwendet. Alle Sekundär-Antikörper wurden in NEN-Blocklösung verdünnt, die Inkubation erfolgte für 1–2 h bei RT. Gebundene POD wurde durch Umsetzung des Farbstoffes 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) in ein rotbraunes Farbprodukt sichtbar gemacht. Die Inkubation mit AEC-Arbeitslösung erfolgte für ca. 5 min. Die Kerne wurden durch Hämatoxilin (Merck Chemicals, Darmstadt, Germany) gegengefärbt. Die Objektträger wurden mit Kaisers Glyceringelatine (Merck, Darmstadt) eingedeckt und mit einem Deckglas abgeschlossen.



Peroxidase-Block	1 mM Natriumazid, 10 mM Glukose, 1 U/ml Glukoseoxidase (Sigma-Aldrich) in PBS
Waschpuffer	PBS, 0,05 % Tween 20
NEN-Blocklösung	PBS, 10 % FCS, 0,5 % NEN-Block (PerkinElmer Life And Analytical Sciences, Wellesley, MA, USA)
AEC-Stammlösung	1 Tablette AEC (Sigma-Aldrich) in 2,5 ml N, N Dimethylformamid (DMF) gelöst
AEC-Arbeitslösung	5 % AEC-Stammlösung, 50 mM Natrium-Acetatpuffer (pH 5,0), 0,015 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Mayers Häkalaun	3,1 mM Hämatoxilin, 1 mM NaIO <sub>3</sub> , 105 mM Kalialaun, 302 mM Chloralhydrat, 4,7 mM Zitronensäure

### 2.8.5 Nachweis von Eisen

Eisenhaltige Partikel oder Zellen können mittels der Preußisch-Blau-Reaktion (Hallgren and Sourander, 1958) (oder *Perl's reaction*) im Gewebe oder in Zellsuspensionen nachgewiesen werden. Die im Reaktionsansatz enthaltene Salzsäure ionisiert das Eisen, welches eine hohe Affinität zum ebenfalls im Reaktionsansatz enthaltenen Ferrocyanid entwickelt. Kalium wird aus der Verbindung verdrängt und das schwer lösliche Ferriferocyanid gebildet, welches die charakteristische namensgebende blaue Farbe entwickelt. In dieser Arbeit wurde dieser Eisennachweis für die Detektion der zur Zell-Markierung verwendeten anti-CD4-Magnetpartikel (siehe 2.2.8.2) eingesetzt. Kryoschnitte des zu untersuchenden Gewebes oder Zytospins wurden nach der Fixierung in Azeton (siehe 2.8.3) kurz getrocknet und für 20 min bei RT mit gleichen Teilen von 10%igem gelben Blutlaugensalz (K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> x 3 H<sub>2</sub>O (Sigma), verdünnt mit aqua dest.) und Salzsäure (Merck, mit aqua dest. auf 20 % verdünnt) inkubiert. Nach kurzem Waschen der Proben in destilliertem Wasser wurde die Kernfärbung der Zellen mit Mayers Häkalaun durchgeführt und die Objektträger eingedeckelt (siehe 1.7.4).

## 2.9 Isotypbestimmung mittels ELISA

Die ICOS-spezifischen Antikörper, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, wurden in der AG Krocze (nicht diese Arbeit) mittels Fusion generiert und aufgereinigt. Die Isotypen der mAk wurden in dieser Arbeit bestimmt. 96er-Mikrotiterplatten (MaxiSorb, Nunc) wurden mit 7,5 µg/ml Ziege-anti-msIg (50 µl/Reaktionsnapf, Southern Biotech Association) in PBS über Nacht bei 4°C beschichtet. Nach dreimaligem Waschen (PBS, 0,1 % TWEEN 20 (Sigma)) wurden freie Bindungsstellen durch Inkubation für eine Stunde bei RT mit Blocklösung (siehe unten) abgesättigt (200 µl/Reaktionsnapf;). Nach viermaligem Waschen erfolgte die Inkubation (1 h, RT) mit je 150 ng/ml der Proben und je 100 ng/ml der Positivkontrollen IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3 (Verdünnung in Blocklösung). Nach sechsmaligem Waschen wurde mit POD-gekoppelten Antikörpern gegen murines IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b oder IgG3 (Verdünnung in Blocklösung, SBA) für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde sechsmalig gewaschen und die Farbreaktion durch Zugabe von 100 µl/Reaktionsnapf TMB-Lösung ausgelöst (siehe unten). Die Farbreaktion wurde nach 3–10 min durch Zugabe von 100 µl/Reaktionsnapf 1 M Schwefelsäure gestoppt. Die Auswertung der Reaktion erfolgte als Ja-Nein-Aussage über den Farbumschlag der jeweiligen Probe.

Blocklösung      PBS, 1 % BSA (Fraktion V, Serva, Heidelberg)

Substratpuffer    0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05 M Zitronensäure, pH 5

TMB-Lösung      1    Tablette    3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin    (Sigma-Aldrich)    in  
Substratpuffer, 0,006 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

## 2.10 Statistische Analysen

Alle statistischen Analysen erfolgten mit der Prism Software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). In den jeweiligen Graphen stellt jedes Symbol ein Tier dar. Angegeben ist der Mittelwert für alle zugehörigen Tiere einer Gruppe und die Signifikanz im Falle eines Unterschiedes. Zur Berechnung der p-Werte wurde der Mann-Whitney U Test

angewendet. Die Qualität der Signifikanz ist durch \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  und \*\*\*  $p < 0.001$  gekennzeichnet.

### 3 Ergebnisse

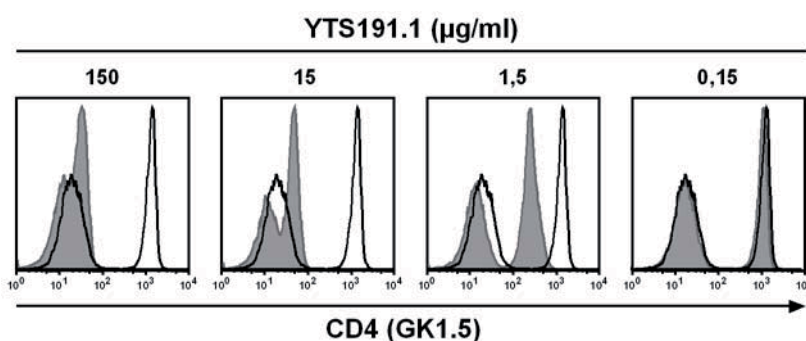
#### 3.1 Etablierung des *in vivo* CD4 T-Zelldepletion-Modells

Das Modell der CD4<sup>+</sup> T-Zelldepletion (CD4 TZD) mit anti-CD4 mAk wurde in dieser Arbeit zur Untersuchung grundlegender Mechanismen der Zielzelldepletion *in vivo* u.a. deshalb gewählt, weil die Zielpopulation mit 15–20 % in der Milz und ca. 30 % in Lymphknoten (Lk) relativ groß ist, was für die Analyse der Depletion vorteilhaft ist. Darüber hinaus wird das Zielmolekül konstitutiv exprimiert und ist zu jedem Zeitpunkt für den depletierenden mAk zugänglich. Außerdem wurde die CD4 TZD in vielen Studien (Cobbald et al., 1984; Jamali et al., 1992; Wofsy et al., 1985) bereits angewandt, so dass von den daraus resultierenden Erfahrungen profitiert werden konnte. In den meisten Studien erfolgte die Depletion mit den anti-CD4 mAk GK1.5 oder YTS191.1 meist vorbereitend für weitere Untersuchungen (Gavett et al., 1994) und es wurden wiederholt große Mengen des jeweiligen mAk verabreicht, um eine vollständige Eliminierung der Zellen herbeizuführen. Die vorliegende Arbeit hatte jedoch keine vollständige Depletion der CD4<sup>+</sup> TZ sondern die Untersuchung der zugrunde liegenden Mechanismen zum Ziel. Daher wurde im Folgenden entsprechend den Literaturangaben ein geeignetes Protokoll in Bezug auf die Dosis des mAk, den zeitlichen Verlauf der Depletion und die Bestimmung der an der Depletion beteiligten Organe etabliert. Für *ex vivo* Analysen wurde ein zweiter anti-CD4 mAk (GK1.5) verwendet, um die mögliche Selbst-Blockade des *in vivo* applizierten mAk YTS191.1 zu vermeiden.

##### 3.1.1 Test auf gegenseitige Blockade zweier anti-CD4 mAks *in vitro*

Zur Überprüfung, ob das CD4-Molekül trotz Bindung von YTS191.1 von GK1.5 erkannt werden kann, wurde ein Test auf gegenseitige Blockade der mAk *in vitro* durchgeführt. Milzzellen wurden mit 150 bis 0,15 µg/ml ungekoppeltem YTS191.1 für 15 min auf Eis inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit Hapten-gekoppeltem, optimal titrierten GK1.5 für 15 min auf Eis gefärbt. Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen ergab, dass GK1.5 für die *ex vivo* Analyse YTS191.1-vorinkubierter Zellen geeignet ist, da unterhalb einer Konzentration von 15 µg/ml YTS191.1 eine Detektion

von CD4 mit GK1.5 in geringem Maße wieder möglich ist (Abb. 4). Je geringer die Konzentration des eingesetzten YTS191.1 ist, desto besser kann CD4 über GK1.5 detektiert werden. Bei der Applikation eines mAk *in vivo* kommt es innerhalb des Organismus durch Abbau und unspezifische Bindung des mAk an Gewebestrukturen zum Verlust der effektiven Menge des Proteins. Zur Abschätzung der physiologischen Konzentration von 100 µg YTS191.1 *in vivo* applizierten YTS191.1 würde man diesen Proteinverlust und das Blutvolumen einer Maus von ca. 2 ml einbeziehen. Theoretisch könnte die physiologische Konzentration von YTS191.1 in den untersuchten Organen in dem Bereich liegen, in dem GK1.5 zur Detektion von CD4 genutzt werden kann.

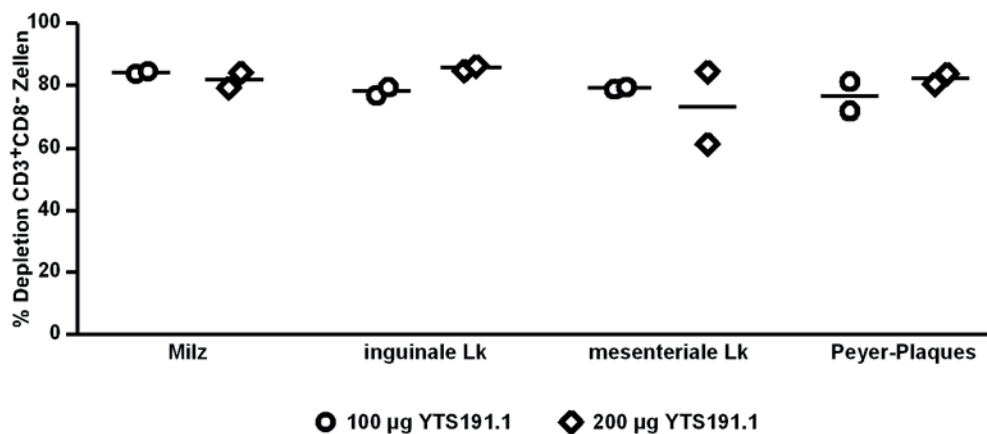


**Abb. 4**      **Test auf gegenseitige Blockade der beiden anti-CD4 mAk GK1.5 und YTS191.1**  
Die durchflusszytometrische Detektion von CD4 mit GK1.5 auf YTS191.1-vorinkubierter Zellen wurde *in vitro* getestet. Milzzellen wurden mit den angegebenen Mengen ungekoppeltem YTS191.1 vorinkubiert und mit Hapten-gekoppeltem GK1.5 gefärbt. Die Färbung von GK1.5 nach Vorinkubation mit YTS191.1 ist grau unterlegt, die Kontrollfärbung ohne Vorinkubation mit YTS191.1 ist in schwarzen offenen Histogrammen dargestellt.

### 3.1.2 Die mAk-vermittelte CD4 TZD ist mit verschiedenen Dosen und in verschiedenen Organen nachweisbar

Zunächst wurde für die Etablierung des in dieser Arbeit verwendeten CD4 TZD-Modells eine effektive Dosis des depletierenden mAk ermittelt. C57BL/6-wt-Mäusen wurden dazu 50, 100 oder 200 µg des mAk YTS191.1 verabreicht und nach 48 h die Milz auf die Frequenz der Zielzellen hin durchflusszytometrisch analysiert. Aus dem Verhältnis der Zielzell-Frequenz in Kontrolltieren und mAk-behandelten Tieren wurde dann die Depletionseffizienz berechnet (siehe Kapitel 2.5.2). Diese war nach 48 h für alle drei Dosen in der Milz vergleichbar hoch und lag bei ca. 80 % (Daten nicht gezeigt). Im

nächsten Schritt wurde die Depletionseffizienz in verschiedenen Lk (inguinal, mesenterial, mandibulär, axillär, popliteal) und Peyer-Plaques bei 100 oder 200 µg mAk nach 72 h untersucht. Wie in Abb. 5 gezeigt, sind die Depletionseffizienzen in allen untersuchten Lk (popliteal, mandibuläre und axilläre Lk nicht gezeigt) und selbst in den in bisherigen Studien nicht untersuchten Peyer-Plaques mit 80-90 % vergleichbar hoch. Aufgrund ausreichender Depletionseffizienz mit 100 µg YTS191.1 in allen untersuchten Organen wurde daher für alle weiteren Untersuchungen diese Dosis als Standard verwendet.



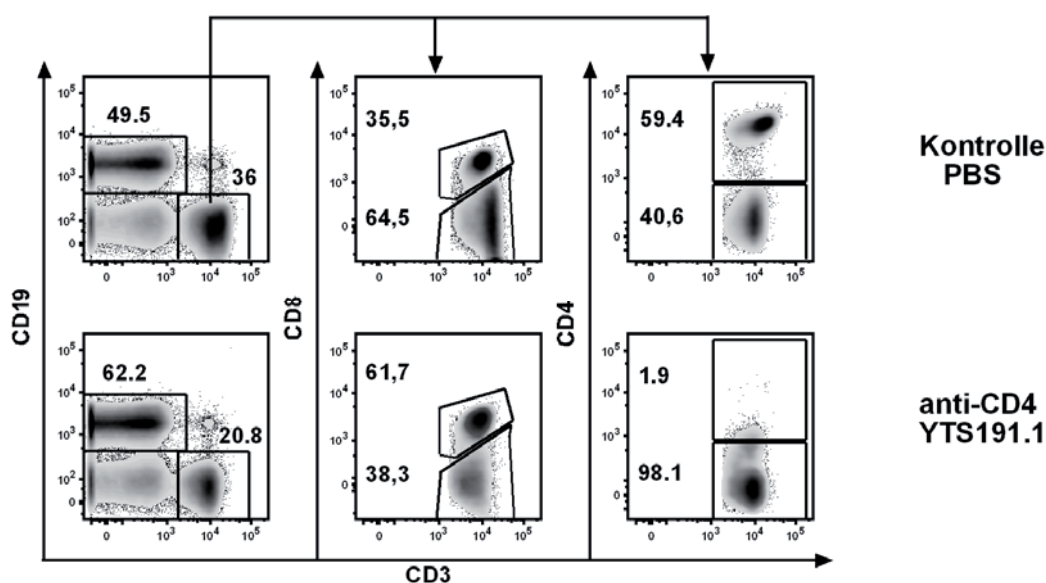
**Abb. 5 Die Depletion mit unterschiedlichen Mengen mAk in verschiedenen lymphatischen Organen ist vergleichbar**

Darstellung der durchflusszytometrisch analysierten und berechneten CD4 T<sub>ZD</sub> in Milz, Lk und Peyer-Plaques von Wt-Tieren 3 Tage nach Applikation von 100 oder 200 µg des mAk YTS191.1.

### 3.1.3 CD4 wird auf der Zelloberfläche moduliert, weshalb die Zielzellen als CD19<sup>-</sup> CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> Population definiert werden

Da in der Literatur die Modulation von CD4 auf der Zelloberfläche nach anti-CD4 mAk-Gabe beschrieben worden ist (Wofsy et al., 1985), wurde dies zunächst *in vivo* getestet. Hierbei wurde sowohl das Ausmaß als auch die Auswirkungen der CD4-Modulation auf das zu etablierende CD4 T<sub>ZD</sub>-Modell untersucht. Splenozyten YTS191.1- bzw. PBS-behandelter Mäuse wurden 48 h nach mAk-Gabe *ex vivo* auf CD4- und CD8-Expression hin analysiert. Nach Eingrenzung der CD19<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> TZ wurden entweder CD8<sup>+</sup> oder CD4<sup>+</sup> TZ dargestellt. Auffällig war die deutliche Abnahme der Färbung von CD4 in mAk-behandelten Tieren, während die Färbung von CD8 unverändert blieb (Abb. 6). Des Weiteren konnte eine prozentuale Zunahme der CD19<sup>+</sup> Zellen und eine Reduktion der

CD3<sup>+</sup> Zellen in mAk-behandelten Tieren beobachtet werden. Darüber hinaus änderten sich auch die relativen Frequenzen der CD8 bzw. CD4-exprimierenden TZ-Fraktionen innerhalb der TZ-Population. Während jedoch die Frequenzänderung der CD8-exprimierenden TZ den realen CD4<sup>+</sup> (CD8<sup>-</sup>) TZ-Verlust widerspiegelt, ist die beinahe vollständige Reduktion der CD4<sup>+</sup> TZ hauptsächlich auf die CD4-Modulation zurückzuführen. Aufgrund der Frequenzverfälschung durch CD4-Modulation wurde deshalb die durchflusszytometrisch analysierte Zielzellpopulation als CD19<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> definiert.

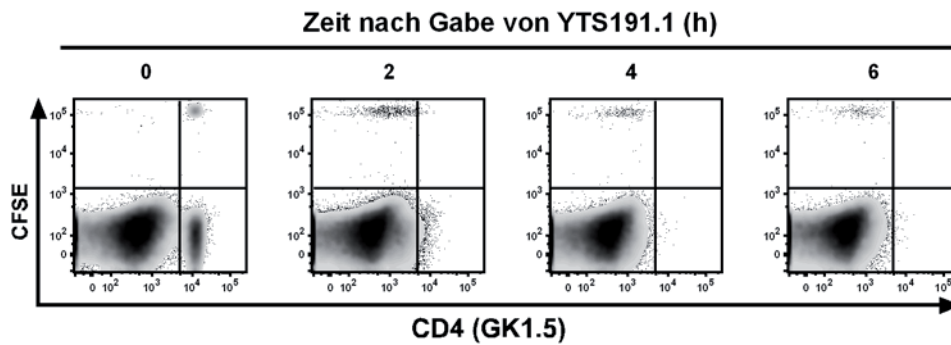


**Abb. 6 Definition der Analyse-Population in der CD4 TZD als CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> Zellen**  
Durchflusszytometrische ex vivo Analyse von Splenozyten 48 h nach PBS- (obere Reihe) oder YTS191.1-Gabe (untere Reihe). CD4 wurde mit GK1.5 gefärbt. Da die Bindung des in vivo applizierten mAk zur deutlichen Reduktion der Färbung von CD4 führt, die Färbung von CD8 hingegen unverändert bleibt, wurde die Zielzellpopulation als CD19<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> definiert.

### 3.1.4 Kinetik der CD4-Modulation *in vivo*

Da die im vorherigen Kapitel beschriebene Analyse der CD4-Modulation *in vivo* nach 48 h erfolgte, wurde nun die Kinetik der CD4-Modulation bestimmt. Sortierte CD4<sup>+</sup> TZ wurden mit CFSE markiert und in Rezipienten-Mäuse transferiert. Nach 24 h wurde der anti-CD4 mAk YTS191.1 oder PBS (nicht dargestellt) verabreicht und Milzzellen zu den in Abb. 7 angegebenen Zeitpunkten analysiert. Bereits nach 2 h konnte das CD4-Molekül nicht mehr vollständig angefärbt werden. Dieser Effekt zeigte sich sowohl auf den

transferierten CFSE<sup>+</sup> TZ als auch auf den endogenen TZ. Die Nicht-Detektierbarkeit des CD4-Moleküls kann sowohl auf einer Modulation des Moleküls als auch auf einer Blockade des Moleküls durch den *in vivo* applizierten mAk beruhen. In Kapitel 3.2 wird die Beobachtung der Nicht-Detektierbarkeit von CD4 nach anti-CD4 mAk-Gabe weiter untersucht.



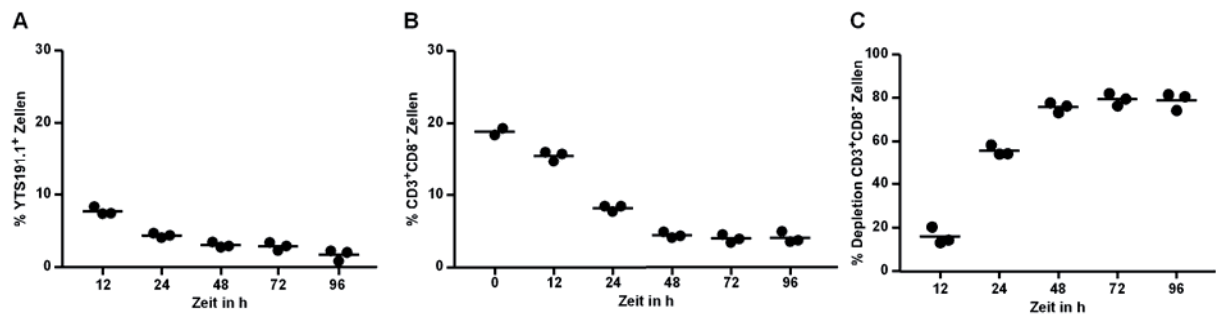
**Abb. 7 Modulation des CD4-Oberflächenmoleküls nach Kontakt mit mAk *in vivo***  
Durchflusszytometrische Analyse von CD4 auf transferierten (CFSE<sup>+</sup>) und endogenen CD4<sup>+</sup> TZ. Negativ magnetisch sortierte CD4<sup>+</sup> TZ wurden mit CFSE markiert und *i.v.* in syngene Mäuse transferiert. 40 h später wurden PBS (nicht dargestellt) oder YTS191.1 *i.p.* verabreicht und nach weiteren 2-6 h die Milzen auf die Expression von CD4 analysiert.

### 3.1.5 Die mAk-vermittelte CD4 TZD ist zeitabhängig

Nachdem eine effektive Dosis des depletierenden mAk und eine geeignete Detektion der Zielzellen etabliert wurde, sollte nun die Kinetik der CD4 TZD bestimmt werden. Die Frequenz der Zielzellen in der Milz, den Peyer-Plaques und verschiedenen Lk von Wt-Tieren wurde daher zu den in Abb. 8 dargestellten Zeitpunkten nach mAk-Gabe auf Einzeltierebene durchflusszytometrisch bestimmt. Außerdem wurde mit Hilfe eines Ratten-Fcγ-spezifischen Sekundärantikörpers die Frequenz der YTS191.1-besetzten, verbliebenen Zellen (Abb. 8 a). Abb. 8 b, c stellt am Beispiel der Milz die Abnahme der Zielzellen über die Zeit und die daraus resultierende Zunahme der berechneten Depletionseffizienz dar. Bereits nach 12 h konnte eine leichte Reduktion der Zielzellen beobachtet werden, die bis zu 48 h stetig zunahm, so dass nach 96 h nur noch ca. 5 % Zielzellen detektiert werden konnten. Diese nicht-depletierte Zellfraktion repräsentiert die CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> TZ, die aufgrund der Modulation des CD4-Moleküls (siehe 3.1.3) in den als CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> definierten Zielzellen immer enthalten sind. In Korrelation zu den Zielzellen nahmen auch die mAk<sup>+</sup> Zellen ab, was darüber hinaus bedeutet, dass der mAk über die



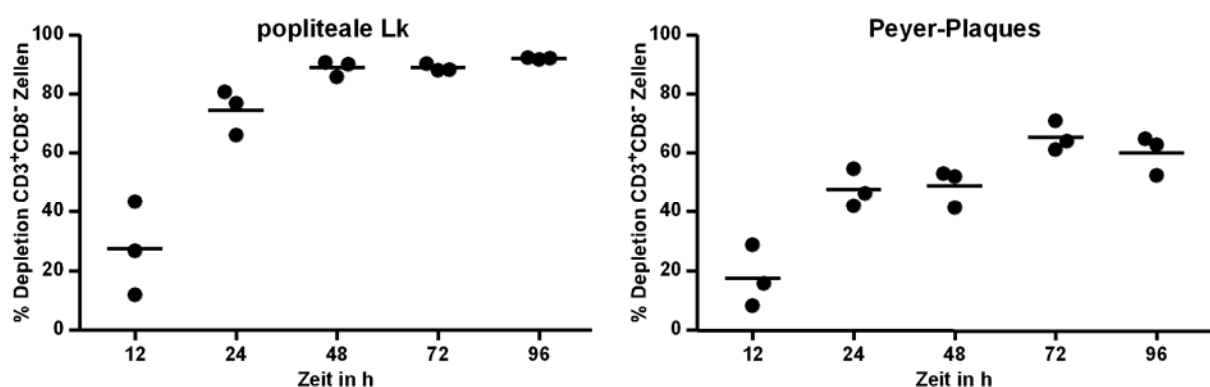
gesamten Analysezeitraum für eine anhaltende Depletion *in vivo* zur Verfügung stand. Die Depletionseffizienz stieg nach 48 h auf ein Plateau von 80 % an.



**Abb. 8 Kinetik der CD4 TZD in der Milz**

Graphische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse der CD4 TZD über die Zeit in der Milz. Dargestellt sind A) die Frequenz der YTS191.1<sup>+</sup> Zellen, B) die Frequenz und C) die errechnete Depletion der Zielzellen.

In Analogie zur Milz wurde der zeitliche Verlauf der CD4 TZD auch in den Lk (gezeigt für die poplitealen Lk) und Peyer-Plaques untersucht (Abb. 9). Die Depletionskinetik der Lk ist mit der in der Milz vergleichbar, erreichte das Depletionsmaximum aber bei 90 %. Im Gegensatz dazu konnte in den Peyer-Plaques die maximale und im Vergleich zu den anderen Organen auch geringere Depletion von 70 % erst nach 72 h detektiert werden. Aufgrund der maximalen Depletion nach 2 Tagen in der Milz und den Lk wurde dieser Zeitpunkt für weitere Analysen festgelegt.



**Abb. 9 Kinetik der CD4 TZD in Lk und Peyer-Plaques**

Graphische Darstellung der durchflusszytometrisch ermittelten, berechneten Depletionskinetik in Lk und Peyer-Plaques. Die jeweiligen Organe wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach YTS191.1-Gabe analysiert.

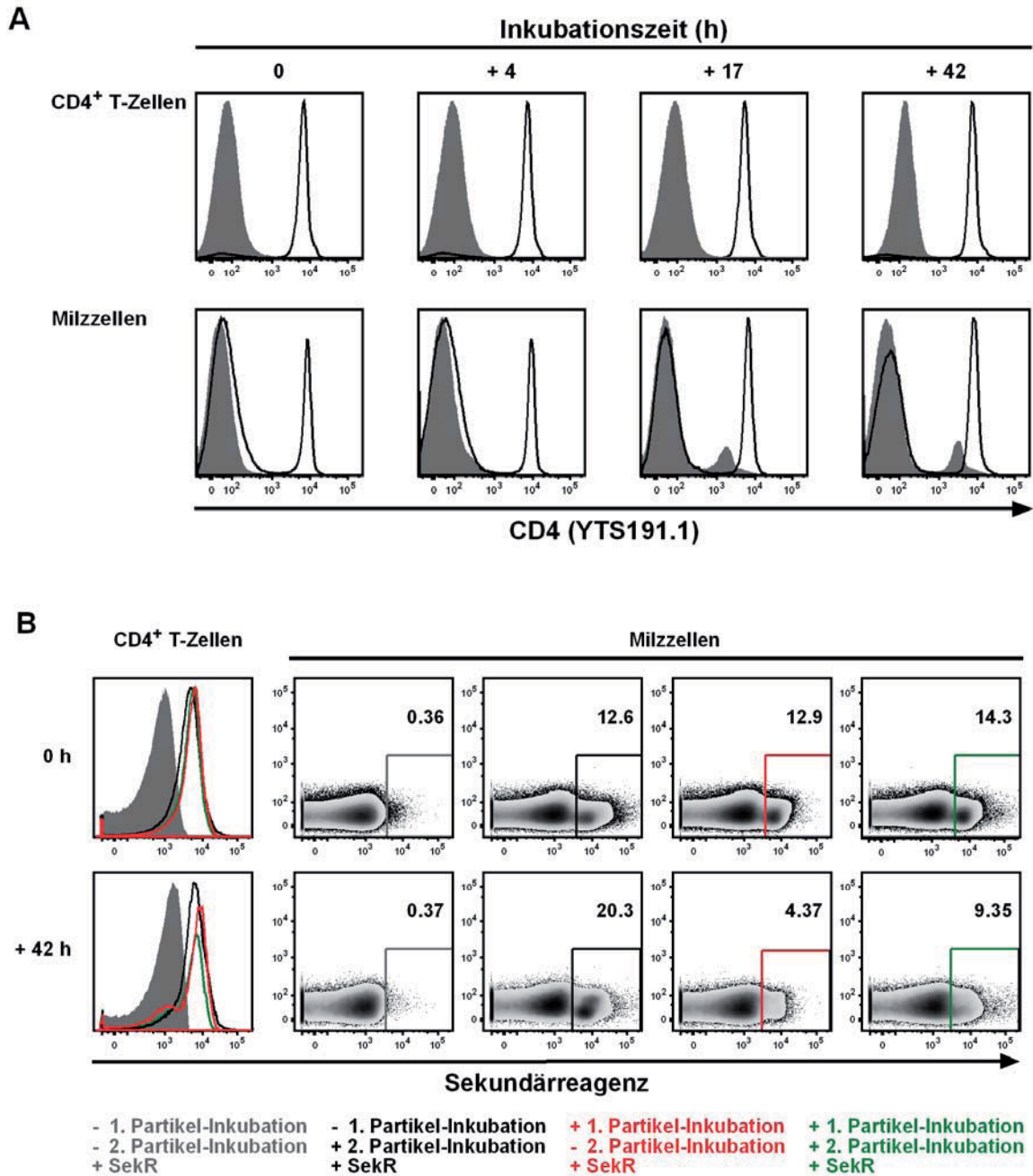
### **3.2 Das CD4 Oberflächenmolekül wird nach Kontakt mit mAk von der Oberfläche moduliert**

Da sowohl in eigenen *in vivo* Experimenten als auch in der Literatur die Modulation von Oberflächen-CD4 nach mAk-Gabe beobachtet wurde (Wofsy et al., 1985), wurden weiterführende *in vitro* Experimente durchgeführt. Dabei wurde zunächst getestet, ob und unter welchen Bedingungen CD4 moduliert wird. Die fehlende Detektion von CD4 kann auch auf einer Blockade durch die Bindung des *in vivo* applizierten mAk beruhen (siehe Abb. 4). Im Falle einer Modulation wurde untersucht, ob dem möglicherweise eine Internalisierung oder ein Abschneiden des Moleküls von der Oberfläche zugrunde liegt.

#### **3.2.1 Das CD4-Oberflächenmolekül wird moduliert, wobei CD4<sup>+</sup> TZ-externe Faktoren beteiligt sind**

In einem ersten Experiment wurden sortierte CD4<sup>+</sup> TZ bzw. unfractionierte Milzzellen für 1 h bei 37 °C mit oder ohne anti-CD4-Magnetpartikel inkubiert (0 h-Zeitpunkt) und nach dem Entfernen überschüssiger Magnetpartikel für weitere 4, 17 oder 42 h bei 37 °C kultiviert. Zu jedem Zeitpunkt wurden drei Färbungen durchgeführt. 1. Zur Detektion von nicht mit mAk-Magnetpartikeln besetztem CD4 wurden die Zellen mit Hapten-gekoppeltem YTS191.1 gefärbt (Abb. 10 a). 2. Für die Analyse der Partikel auf der Zelloberfläche wurden die Zellen mit einem Fcγ-spezifischen Sekundärreagenz inkubiert, das den mAk an den Magnetpartikeln erkennt. 3. Die Zellen wurden erst mit weiteren anti-CD4-Magnetpartikeln inkubiert und anschließend mit dem Sekundärreagenz gefärbt. Sollte das CD4-Molekül internalisiert (und unter Umständen rezirkuliert) werden, müssten weniger Partikel bzw. mehr unbesetztes CD4 detektiert werden können. In Abb. 10 a ist zunächst die Färbung des CD4-Moleküls mit Hapten-gekoppeltem YTS191.1 über die Zeit dargestellt. Im Fall der sortierten CD4<sup>+</sup> TZ konnte CD4 (grau unterlegte Histogramme), im Vergleich zur Färbung ohne Magnetpartikel-Inkubation (schwarze offene Histogramme), zu keinem Zeitpunkt angefärbt werden. Dies deutet auf eine Blockade des Moleküls durch die permanente Präsenz der Partikel auf der Oberfläche hin. Im Gegensatz dazu war CD4 in dem unsortierten Zellgemisch nach anfänglicher Blockade ab 17 h wieder detektierbar. Allerdings konnte CD4 nur auf einer kleineren Zellpopulation und mit einer schwächeren Intensität im Vergleich zur

Inkubation ohne Magnetpartikel angefärbt werden. Die Resultate bezüglich der CD4-Detektion konnten auch mit dem Magnetpartikel-Besatz der Zellen (Abb. 10 b) korreliert werden. Während in sortierten CD4<sup>+</sup> TZ die Population der Magnetpartikel<sup>+</sup> Zellen weder signifikant ab- noch zunahm, konnten in den unsortierten Milzzellen deutliche Änderungen beobachtet werden. Zum einen konnten im Verlauf der Kultur zu den jeweiligen Zeitpunkten mehr Zellen erstmalig mit Magnetpartikeln beladen werden (schwarzer Kasten), was auf das Sterben anderer Zellpopulationen (wie BZ, DZ oder Makrophagen) allein durch die Kultivierung zurückgeführt werden kann. Des Weiteren nahm die Magnetpartikel<sup>+</sup> Population der in Gegenwart von Magnetpartikeln kultivierten Zellen über die Zeit signifikant ab (roter Kasten), was sowohl auf eine mögliche Ablösung als auch auf eine Internalisierung der Partikel über CD4 hindeuten kann. Da zu späteren Zeitpunkten jedoch auch erheblich weniger Zellen erneut mit Magnetpartikeln beladen werden konnten (grün), spricht dies eher für eine Internalisierung und möglicherweise beginnende Rezirkulation des CD4-Moleküls. Das unterschiedliche Verhalten von CD4 in sortierten CD4<sup>+</sup> TZ und unsortierten Milzzellen gibt deutliche Hinweise darauf, dass die Internalisierung des Moleküls von einem oder mehreren CD4<sup>+</sup> TZ-externen Faktoren abhängig ist.



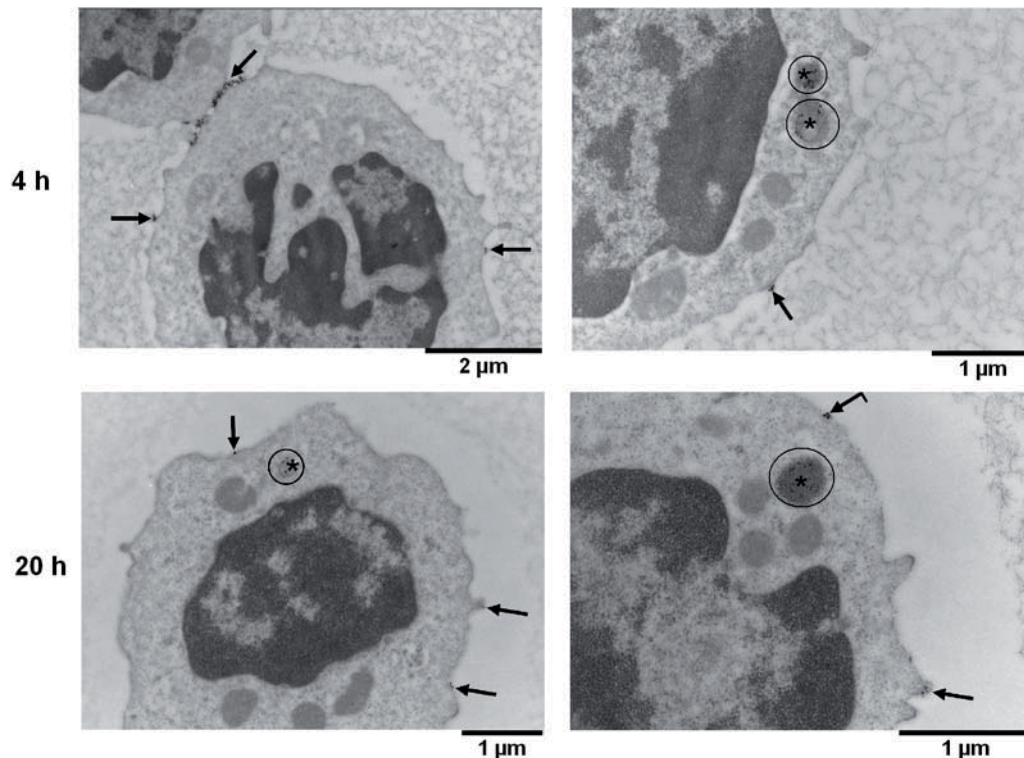
**Abb. 10      Modulation des CD4-Oberflächenmoleküls ist durch Internalisierung bedingt und hängt von CD4<sup>+</sup> TZ-externem Faktor ab**

Durchflusszytometrische Analyse von sortierten und unfractionierten Milzzellen in Zellkultur über die Zeit nach einstündiger Beladung mit anti-CD4-Magnetpartikeln und Waschen der Zellen. In A) ist die Detektion der CD4-Expression mit Hapten-gekoppeltem YTS191.1 nach Inkubation mit anti-CD4-Magnetpartikeln (grau unterlegte Histogramme) oder ohne Magnetpartikel (weiße Histogramme) dargestellt. In B) ist die Färbung mit Sekundärreagenz (SekR), welches gegen die anti-CD4-Magnetpartikel gerichtet ist, in folgenden Situationen dargestellt. Das graue Histogramm/Kasten repräsentiert die Färbung des SekR nach Kultur der Zellen ohne Magnetpartikel. Das schwarze Histogramm/Kasten zeigt die Färbung des SekR auf Zellen, welche ohne Magnetpartikel kultiviert und erst nach der Kultur für die

Färbung mit Magnetpartikeln inkubiert wurden. Das rote Histogramm/Kasten repräsentiert die Färbung des SekR auf Zellen, die in Gegenwart von Magnetpartikeln kultiviert und nicht noch einmal mit den Partikeln für eine Färbung inkubiert wurden. Das grüne Histogramm/Kasten stellt die Färbung des SekR auf Zellen dar, die sowohl mit Magnetpartikeln kultiviert als auch für die Färbung mit Magnetpartikeln inkubiert wurden.

### 3.2.2 Das CD4-Molekül wird internalisiert

Um die wahrscheinliche Internalisierung von CD4 nach Kontakt mit dem mAk noch weiter zu untersuchen, wurden in einem zweiten Schritt elektronenmikroskopische Analysen durchgeführt. Unfraktionierte Milzzellen wurden bei 37 °C mit anti-CD4-Magnetpartikeln für 4 und 20 h *in vitro* inkubiert. Nach dem Entfernen überschüssiger Magnetpartikel wurden die Zellen auf die Lokalisation der Partikel hin analysiert. Abb. 11 zeigt in der oberen Reihe Aufnahmen der Zellen nach 4 h Inkubation, in der unteren Reihe nach 20 h. Zu beiden Zeitpunkten konnten Magnetpartikel sowohl auf der Zelloberfläche als auch in Endosomen detektiert werden. Auffällig war die Ansammlung der Partikel an Orten des Zell-Zell-Kontakts. Nach 20 h Inkubation konnte sogar eine beginnende Endozytose beobachtet werden.



**Abb. 11 Internalisierung des CD4-Oberflächenmoleküls nach Kontakt mit mAk *in vitro***  
Elektronenmikroskopische Analyse von unsortierten Milzzellen nach 4 oder 20 h Inkubation mit anti-CD4-Magnetpartikeln bei 37 °C und zweimaligem Waschen. Magnetpartikel waren auf der Zelloberfläche und in Endosomen \* detektierbar. Nach 20 h Inkubation konnte eine beginnende Endozytose beobachtet werden (gut sichtbar auf vergrößerten Aufnahmen).

### 3.3 Analyse der CD4 TZD *in vivo*

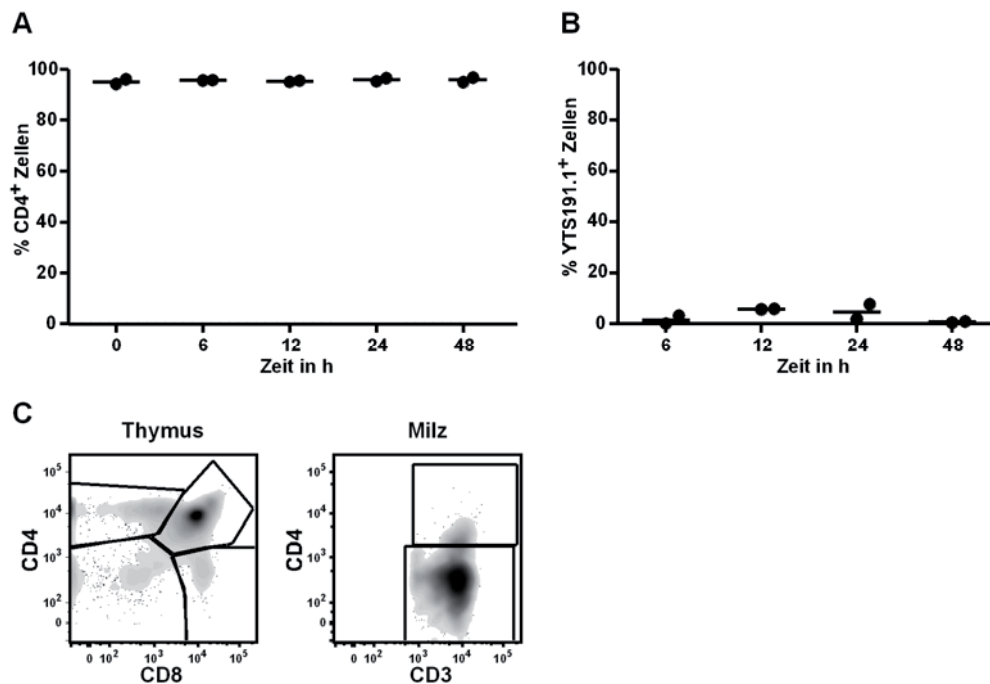
Nachdem ein geeignetes Protokoll zur effektiven CD4 TZD etabliert worden ist, sollte nun untersucht werden, in welchen weiteren Organen eine Depletion stattfindet, von welchen Faktoren diese abhängig ist und welche TZ-Subtypen betroffen sind.

#### 3.3.1 Der Thymus ist von der YTS191.1-vermittelten CD4 TZD ausgeschlossen

Da der Thymus eine zentrale Stellung in der Generierung des peripheren CD4<sup>+</sup> TZ-Repertoires *in vivo* einnimmt, wurde auch in diesem Organ die mAk-vermittelte Depletion und deren Kinetik bestimmt. Im Gegensatz zur bereits in Kapitel 3.1 beschriebenen Depletion in sekundären lymphatischen Organen konnte im Thymus keine CD4<sup>+</sup> TZ-Reduktion beobachtet werden (Abb. 12). Im Vergleich zur Milz, in der zu



diesem Zeitpunkt die Depletion auch mit der Modulation von CD4 korreliert, konnte im Thymus ebenfalls keine Modulation von CD4 beobachtet werden (Abb. 12 c). Darüber hinaus war der verabreichte mAk nur bis zu 24 h und maximal auf 6 % der Thymozyten nachweisbar. Diese Ergebnisse deuten auf eine eingeschränkte Zugänglichkeit des Thymus für den mAk hin, welche im Ausbleiben der mAk-vermittelten Reaktionen resultiert.



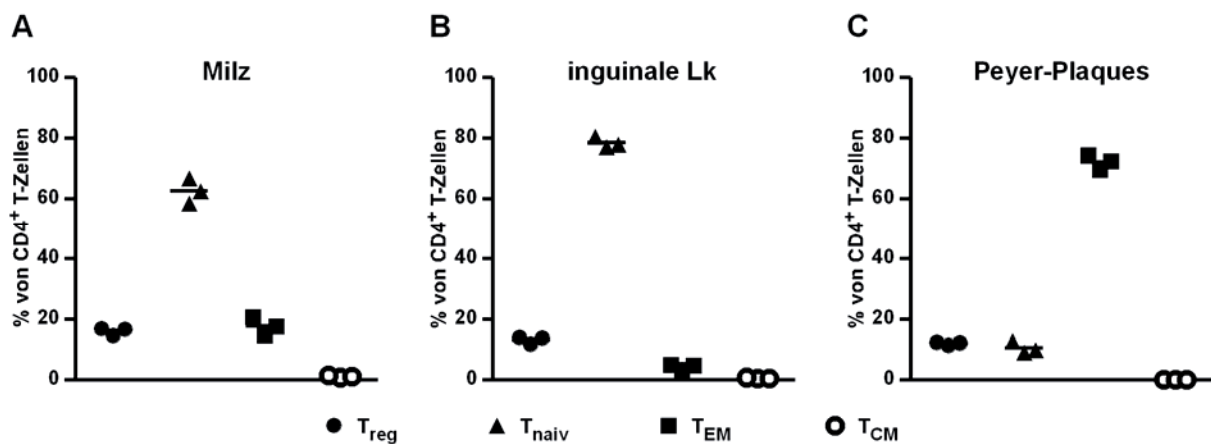
**Abb. 12 Im Thymus erfolgt keine mAk-vermittelte CD4 TZD**  
 Graphische Darstellung der YTS191.1 vermittelten CD4 TZD im Thymus. Dargestellt sind A) die Frequenz von CD4<sup>+</sup> Zellen und B) die Frequenz der YTS191.1<sup>+</sup> Thymozyten über die Zeit. C) Durchflusszytometrische Darstellung der CD4-Expression in Thymus und Milz 48 h nach mAk-Gabe.

### 3.3.2 Depletion von CD4<sup>+</sup> TZ-Subtypen

Da in dieser Arbeit die Depletion von CD4<sup>+</sup> TZ untersucht werden sollte, war es wichtig, die CD4<sup>+</sup> TZ- Subtypen und deren CD4-Expression näher zu charakterisieren. Außerdem wurde untersucht, welchen Einfluss die gewählte Analyse-Strategie auf Aussagen bezüglich der Depletion einzelner CD4 TZ-Subtypen hat.

### 3.3.2.1 CD4<sup>+</sup> TZ-Subtypen im Ruhezustand

CD4<sup>+</sup> TZ sind keine homogene Population sondern setzen sich aus mehreren Subtypen zusammen. In der vorliegenden Arbeit wurden regulatorische TZ (Foxp3<sup>+</sup>; T<sub>reg</sub>), naive TZ (CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>; T<sub>naiv</sub>), Effektor-T-Gedächtniszellen (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>; T<sub>EM</sub>) und zentrale T-Gedächtniszellen (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>; T<sub>CM</sub>) untersucht (Abb. 13). Im Ruhezustand stellen in der Milz und den Lk naive TZ mit 70-80 % den größten Anteil innerhalb der CD4<sup>+</sup> TZ dar. T<sub>reg</sub> repräsentieren mit ca. 15 % den zweitgrößten Subtyp in den Lk, während sie in der Milz erst nach den Effektor T-Gedächtniszellen (20 %) den drittgrößten Subtyp ausmachen. Zentrale T-Gedächtniszellen sind in allen Organen der kleinste Subtyp (< 1 %). Die Peyer-Plaques unterscheiden sich von den anderen Organen dadurch, dass Effektor-T-Gedächtniszellen der größte Subtyp sind (ca. 75 %) und naive TZ und T<sub>reg</sub> jeweils nur ca. 10 bzw. 14 % der CD4<sup>+</sup> TZ darstellen.



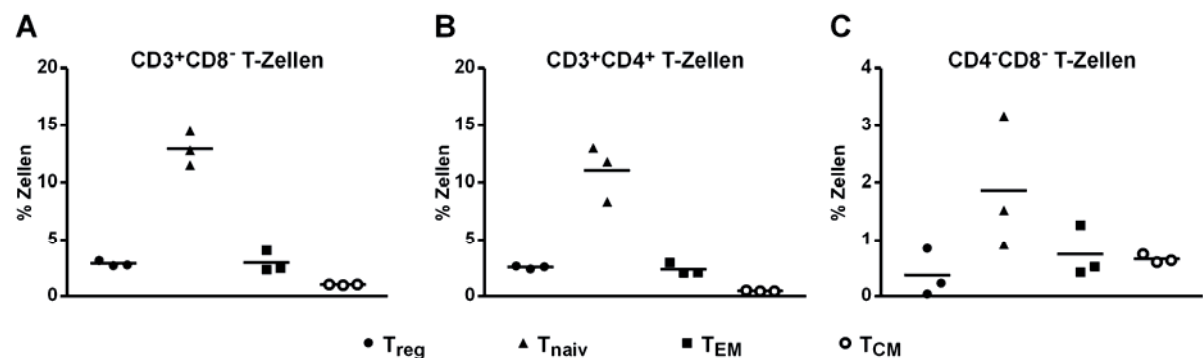
**Abb. 13 Die Subtypen von CD4<sup>+</sup> TZ setzen sich in verschiedenen Organen unterschiedlich zusammen**

Darstellung der durchflusszytometrisch ermittelten Frequenzen von CD4<sup>+</sup> TZ-Subtypen in Milz, Lk und Peyer-Plaques im Ruhezustand.

Da sich die CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> Zielzellpopulation aus den CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> doppelt-negativen und den CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> TZ zusammensetzt, muss dieser Umstand bei Aussagen bezüglich der CD4<sup>+</sup> TZD berücksichtigt werden. Eine Depletion von 100 % ist nicht möglich, weil die CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> doppelt-negativen TZ nicht depletiert werden können und in der CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> Zielzellpopulation verbleiben. Der Verbleib der CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> doppelt-negativen Zellen hat unterschiedlich große Auswirkungen auf die Depletion der einzelnen TZ-Subtypen (T<sub>naiv</sub>, T<sub>reg</sub>, T<sub>EM</sub> und T<sub>CM</sub>), wie im Folgenden verdeutlicht wird. In Abb. 14 sind zunächst die TZ-



Subtypen in den unterschiedlichen TZ-Populationen, welche über verschiedene Kombinationen von Oberflächenmarkern definiert wurden, dargestellt. Die Frequenzen der einzelnen Subtypen sind innerhalb der  $CD3^+CD8^-$  TZ (Abb. 14 a) und  $CD3^+CD4^+$  TZ (Abb. 14 b) vergleichbar, wobei die  $T_{CM}$  der jeweils kleinste Subtyp sind. Innerhalb der  $CD4-CD8-$  doppelt-negativen TZ (Abb. 14 c) stellen die  $T_{CM}$  jedoch mit einem Prozent einen deutlich größeren Subtyp dar. Daraus resultiert, dass die  $T_{CM}$  der  $CD3^+CD8^-$  Zellen zur Hälfte von den doppelt-negativen Zellen stammen. Da diese Zellen nicht depletiert werden können, ist maximal eine Depletion der  $CD3^+CD8^- T_{CM}$  von 50 % möglich, obwohl die tatsächliche Depletion der  $CD4^+ T_{CM}$  100 % beträgt. Innerhalb der  $CD3^+CD8^- T_{EM}$  stammen ca. drei Viertel der Zellen aus der  $CD3^+CD4^+$ -TZ-Population. Bei einer vollständigen Depletion der  $CD3^+CD4^+ T_{EM}$  würde also nur eine Depletion von 75 % detektiert werden können. Für die naiven Zellen würden die gemessene und die tatsächliche Depletion sogar noch näher beieinander liegen, da die  $CD3^+CD4^+ T_{naiv}$  ca. 85 % der  $CD3^+CD8^- T_{naiv}$  ausmachen.



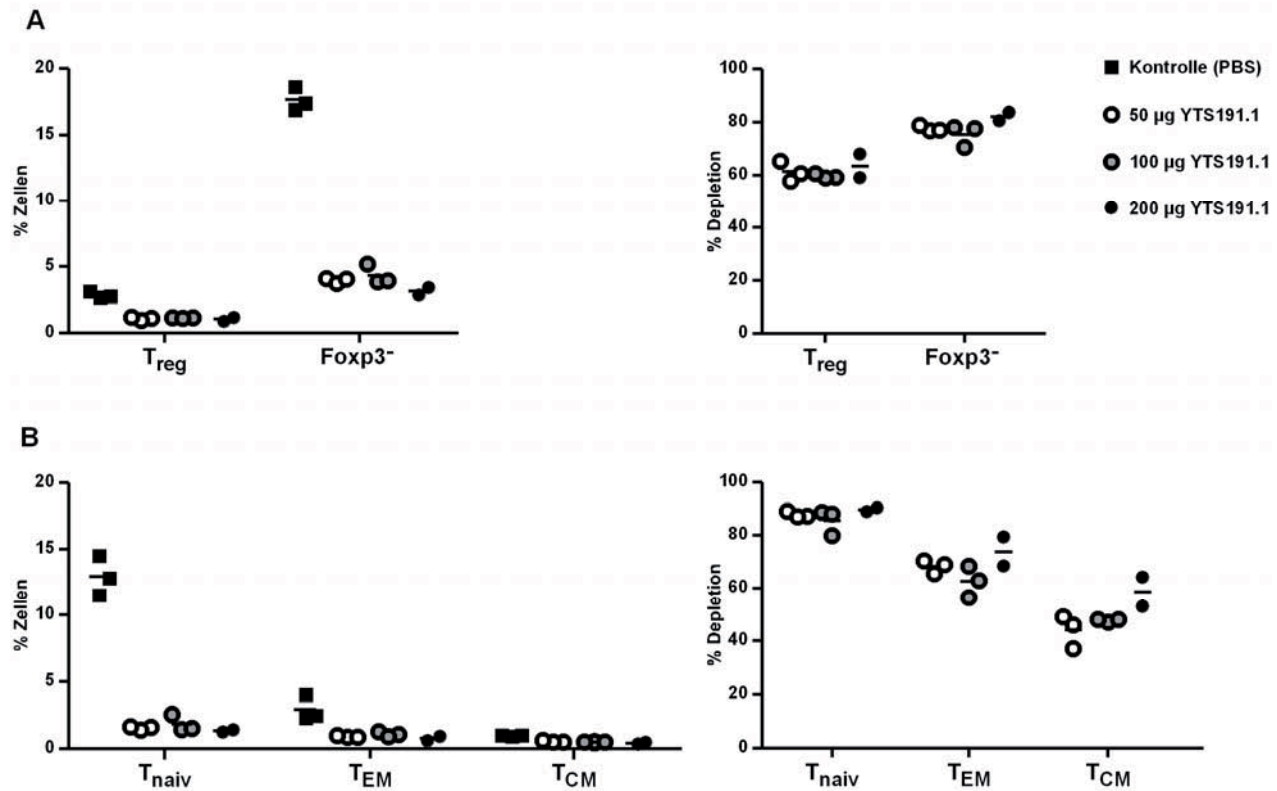
**Abb. 14 Die Frequenzen der TZ-Subtypen variieren in Abhängigkeit von der untersuchten TZ-Population**

Graphische Darstellung der durchflusszytometrisch analysierten Frequenzen von  $T_{reg}$ ,  $T_{naiv}$ ,  $T_{EM}$  und  $T_{CM}$  innerhalb von verschieden definierten TZ-Populationen einer ruhenden Milz. Die Definition der verschiedenen TZ-Populationen resultiert aus der unterschiedlichen Kombinationen von Oberflächenmarkern.

### 3.3.2.2 Die Depletion von $CD4^+$ TZ-Subtypen ist vergleichbar

Die Depletion der  $CD4^+$  TZ-Subtypen wurde in der Milz, den inguinalen Lk und den Peyer-Plaques 48 h nach Gabe von 50, 100 oder 200  $\mu$ g mAk analysiert. Wie in Abb. 15 gezeigt, wurden naive TZ in der Milz mit jeder mAk-Dosis zu 85 % und damit scheinbar stärker als  $T_{EM}$  und  $T_{CM}$  (70 % bzw. 50 %) oder  $T_{regs}$  (60 %) depletiert. Unter Berücksichtigung des zuvor gezeigten Einflusses (3.3.2.1) der doppelt-negativen Zellen

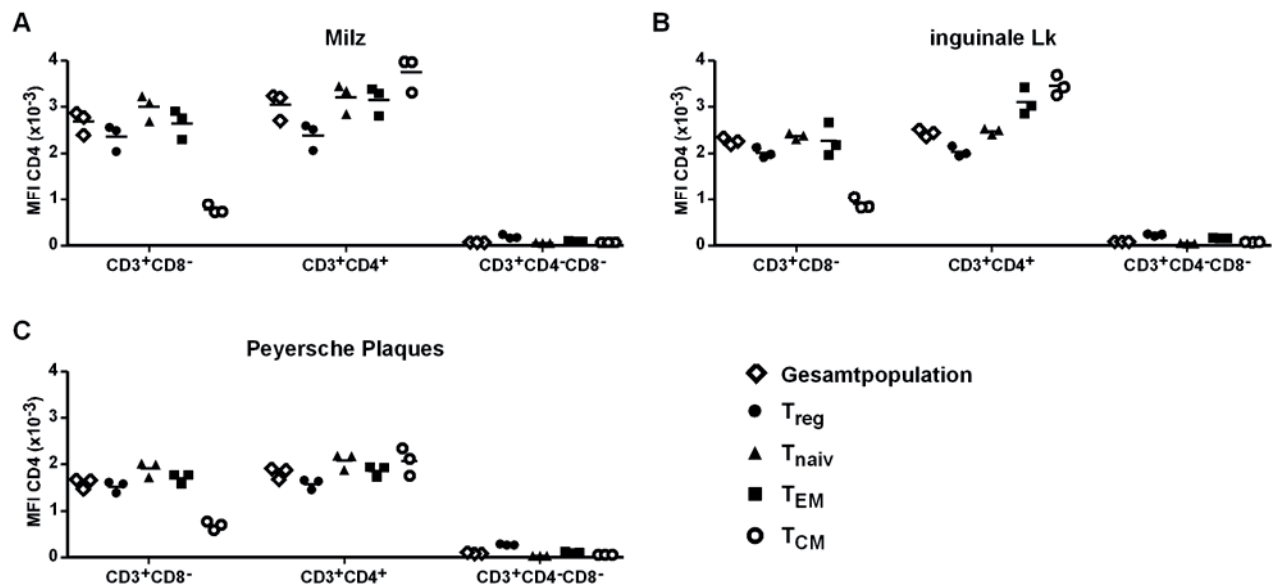
auf die Subtypen der definierten Zielzellpopulation wäre die Depletion der T-Gedächtniszellen mit der der naiven TZ in etwa vergleichbar. In den Lk und Peyer-Plaques zeigte sich eine ähnliche Tendenz (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 15 Depletion von CD4<sup>+</sup> TZ-Subtypen *in vivo***

Graphische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse der Depletion von CD4<sup>+</sup> TZ-Subtypen in der Milz 48 h nach mAk-Gabe (50, 100 oder 200 µg). Dargestellt sind die Frequenz (von lebenden Zellen) und die Depletion von A) T<sub>reg</sub> und Foxp3<sup>-</sup> und B) naiven TZ und T-Gedächtniszellen innerhalb der Zielzellpopulation.

Die vergleichbaren Depletionsniveaus korrelierten mit ähnlichen Niveaus der CD4-Expression der Subtypen. Die in Abb. 16 dargestellten scheinbaren Unterschiede in den mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) für CD4 resultieren aus den leicht unterschiedlichen Größen von naiven und aktivierten (Gedächtniszellen) Zellen (Daten nicht gezeigt). Die aktivierten Zellen exprimieren aufgrund ihrer größeren Oberfläche mehr CD4-Moleküle, was zu einer höheren MFI führt. Die CD4-Dichte auf den Zellen ist aber wahrscheinlich mit der auf naiven Zellen vergleichbar. Die niedrigste CD4-Expression wurde auf DZ gemessen. Eine Depletion dieser Population konnte in der Milz zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

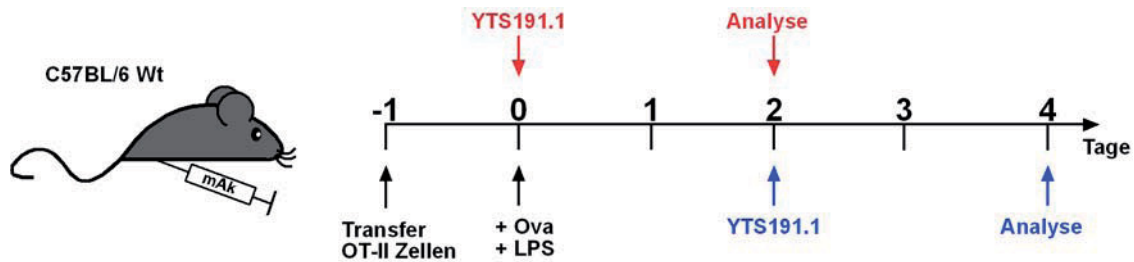


**Abb. 16** Die CD4-Expression auf CD4<sup>+</sup> TZ-Subtypen in verschiedenen Organen im Ruhezustand ist vergleichbar

Durchflusszytometrische Analyse der MFI von CD4 auf T<sub>reg</sub>, naive TZ und T-Gedächtniszellen von Milz, Lk und Peyer-Plaques im Ruhezustand innerhalb der CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Subpopulation, der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Subpopulation und der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>-Subpopulation.

### 3.3.3 Depletion von aktivierten CD4<sup>+</sup> TZ

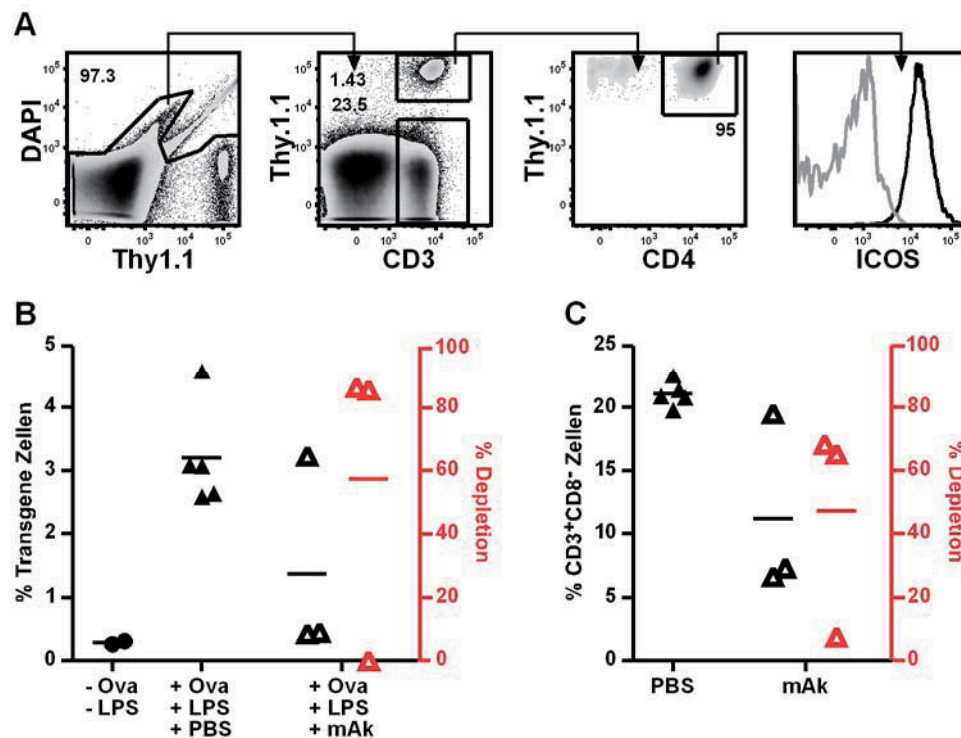
Um zu untersuchen, wie sich die Depletion auf aktivierte TZ auswirkt, wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene TZ-Aktivierungsprotokolle durchgeführt. 24 h nach einem adoptiven Transfer Ova-spezifischer OT-II-Zellen wurden die C57BL/6-Rezipientenmäuse mit Ova und LPS immunisiert. Der depletierende mAk wurde entweder erst 48 h nach Immunisierung (Abb. 17, blau) oder gleichzeitig (Abb. 17, rot) mit den Immunisierungs-substanzen injiziert. Im ersten Fall sollte geprüft werden, ob die Depletion durch erfolgte Aktivierung der Zellen verhindert wird, während der zweite Ansatz die Verfügbarkeit des mAk von Beginn der Aktivierung an sicherstellen sollte.



**Abb. 17 Schema der Depletion von zeitlich unterschiedlich aktivierten Zielzellen**

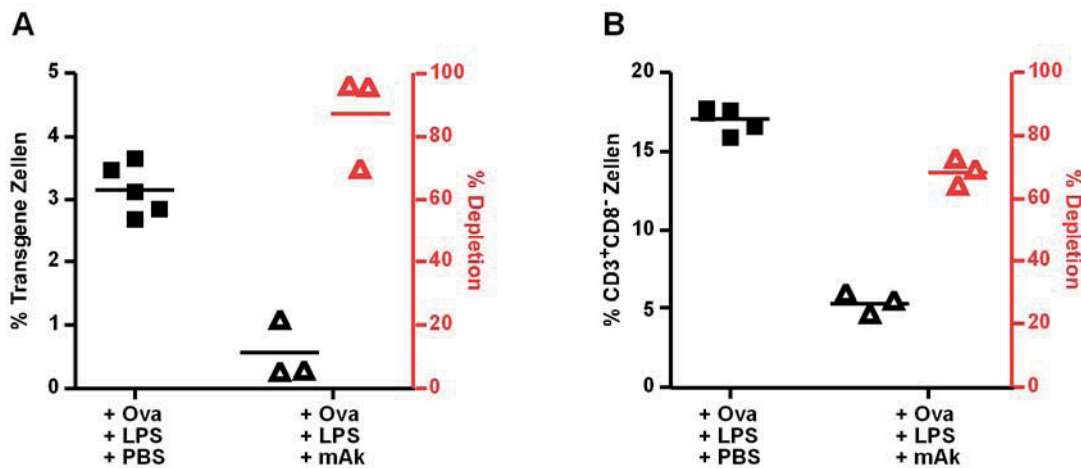
Ova-TZR-transgene OT-II-Zellen wurden 24 h nach dem Transfer in syngene Rezipiententiere mit 2 mg/ml Ova und 10 µg/ml LPS immunisiert. Der depletierende mAk YTS191.1 wurde entweder zeitgleich zur Immunisierung (rot) oder 48 h nach der Immunisierung (blau) appliziert. Die Analyse der Milz erfolgte jeweils 48 h nach mAk-Gabe.

Im ersten Aktivierungsansatz wurde die erfolgreiche Aktivierung der transferierten Zellen ( $\text{Thy1.1}^+$ ) anhand der induzierten ICOS-Expression (Abb. 18 a) und der zunehmenden OT-II-Zellfrequenz im Vergleich zu nicht-immunisierten Tieren 48 h nach Immunisierung verifiziert (Abb. 18 b). Durch die Gabe des mAk war die Frequenz sowohl der transferierten, aktivierten Zielzellen als auch die der endogenen (Abb. 18 c), überwiegend nicht-aktivierten Zielzellen (nicht gezeigt) reduziert. Das Depletionsniveau der transferierten Zellen war um ca. 10 % höher als das der endogenen Zellen, was jedoch aus den unterschiedlichen Detektionsstrategien der Zellen resultiert. Während die transferierten Zellen direkt aufgrund ihres Markers Thy1.1 identifiziert werden konnten, mussten die endogenen Zellen indirekt über CD8 bestimmt werden. Wie schon in 3.3.2 erwähnt, beinhalten die  $\text{CD3}^+\text{CD8}^-$  TZ die  $\text{CD4}^-\text{CD8}^-$  doppelt-negativen TZ, die nicht depletiert werden und die Depletionseffizienz der Zielzellen im Vergleich zu den transferierten Zellen verfälschen.



**Abb. 18**      **Aktivierte und nicht-aktivierte CD4<sup>+</sup> TZ werden gleichermaßen *in vivo* depletiert**  
 Durchflusszytometrische Analyse der A) ICOS-Expression transferierter Ova-TZR-transgener OT-II-TZ 48 h nach Immunisierung mit Ova und LPS im Vergleich zu nicht-immunisierten Zellen (grau) und der Depletion der B) transferierten und C) endogenen TZ in der Milz nach weiteren 48 h nach Gabe von YTS191.1.

In einem alternativen Ansatz wurden die transferierten Zellen gleichzeitig mit der Gabe des mAk YTS191.1 aktiviert (Abb. 17 und Abb. 19). Wie schon im Fall der Voraktivierung wurden sowohl die transferierten als auch die endogenen Zielzellen in hohem Maße depletiert. Die leicht unterschiedlichen Depletionsniveaus resultieren ebenfalls aus den unterschiedlichen Analyse-Parametern und können nicht direkt verglichen werden. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass zumindest mit der hier durchgeführten Aktivierung die Depletion der CD4<sup>+</sup> TZ nicht verhindert wurde.



**Abb. 19** Transferierte und endogene CD4<sup>+</sup> TZ werden während der Aktivierung *in vivo* gleichermaßen depletiert

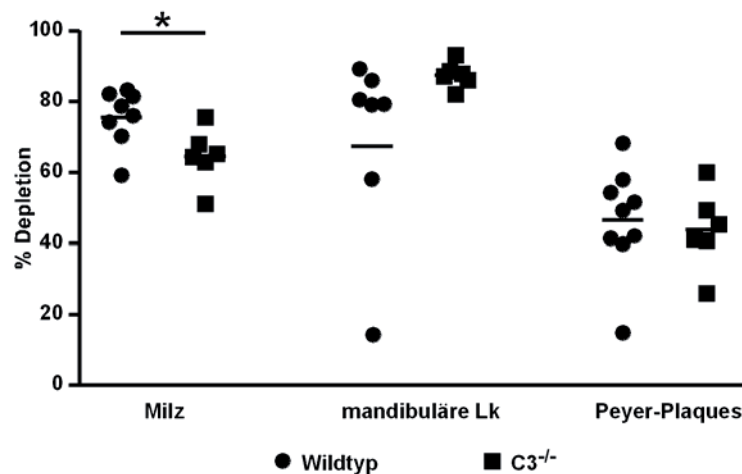
Graphische Darstellung der durchflusszytometrisch analysierten Frequenz und Depletion von A) Ova-TZR-transgenen transferierten und B) endogenen TZ in der Milz 48 h nach Immunisierung mit Ova und LPS gleichzeitig zur Gabe von YTS191.1.

### 3.3.4 Beteiligung von Komplement oder Fcγ-Rezeptoren an der YTS191.1-vermittelten CD4 TZD *in vivo*

In diversen Studien wurden Komplement- oder Fcγ-Rezeptor (FcγR)-abhängige Mechanismen der mAk-vermittelten Depletion von Zielzellen *in vivo* diskutiert (Jamali et al., 1992; Wofsy et al., 1985). Um den Beitrag dieser beiden möglichen Mechanismen zur CD4 TZD zu bestimmen, wurden sowohl Tiere mit einer Defizienz für die zentrale Komplement Komponente 3 (C3) als auch Tiere mit Defizienzen für unterschiedliche FcγR auf ihre Depletionsfähigkeit hin analysiert.

#### 3.3.4.1 Die mAk-vermittelte CD4 TZD verläuft größtenteils C3-unabhängig

Um den Einfluss von Komplement auf die CD4 TZD zu untersuchen, wurden Milz, Lk und Peyer-Plaques von C3- defizienten und Wt-Tieren 48 h nach mAk-Gabe durchflusszytometrisch analysiert. Wie in Abb. 20 gezeigt, konnte kein Unterschied in den Depletionseffizienzen zwischen beiden Gruppen in den Lk und Peyer-Plaques festgestellt werden. In der Milz war die Depletion in C3-defizienten Tieren jedoch verringert, weshalb ein teilweiser Beitrag von Komplement zur CD4 TZD nicht ausgeschlossen werden kann.

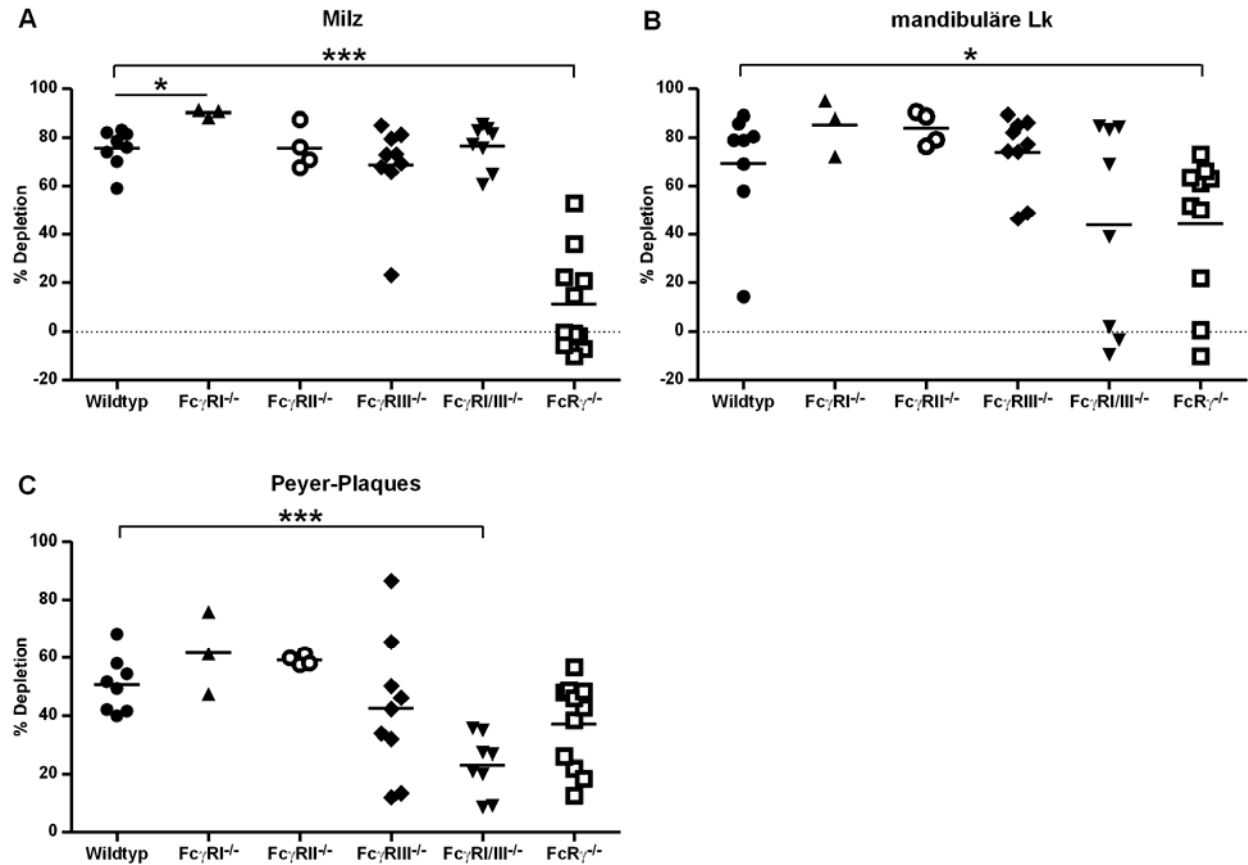


**Abb. 20 Die YTS191.1-vermittelte CD4 TZD ist größtenteils C3-unabhängig**  
Darstellung der berechneten CD4 TZD 48 h nach YTS191.1-Gabe. Milzen, Lk und Peyer-Plaques von C3-defizienten und Wt- Tieren wurden durchflusszytometrisch analysiert.

### 3.3.4.2 Die YTS191.1-vermittelte CD4 TZD ist in verschiedenen Organen von verschiedenen FcγR abhängig

Nachdem Komplement als Hauptmechanismus ausgeschlossen werden konnte, wurde die Beteiligung der einzelnen FcγR an der hier etablierten CD4 TZD analysiert. Die Milz, die mandibulären Lk und die Peyer-Plaques sowohl von FcγRI-, FcγRII- und FcγRIII-einzeldefizienten als auch FcγRI+III-doppeldefizienten, FcRγ-defizienten und Wt-Mäusen wurden 48 h nach YTS191.1-Gabe entnommen und analysiert. Überraschenderweise war die CD4 TZD in verschiedenen Organen von verschiedenen FcγR abhängig. In der Milz konnte nur in den Tieren ohne gemeinsame γ-Kette eine drastische Reduktion der Depletion im Vergleich zu den Wt-Tieren beobachtet werden, wohingegen alle anderen Defizienzen keinen Einfluss hatten (Abb. 21 a). Dies deutet auf einen möglichen Beitrag des vierten, hier nicht untersuchten, FcγR an der Depletion in der Milz hin. In den Lk war die Abhängigkeit der CD4 TZD von der gemeinsamen γ-Kette nicht ganz so stark ausgeprägt. Außerdem deutete sich eine mögliche Beteiligung der FcγRI und III an der Depletion an (Abb. 21 b). Im Gegensatz dazu war die CD4 TZD in den Peyer-Plaques deutlich von den beiden FcγRI und III abhängig (Abb. 21 c). Wie auch in den Lk war die Depletion in FcRγ-defizienten Tieren nicht ganz so stark reduziert wie in der Milz, aber aufgrund der ausgeprägten Varianz in dieser Gruppe in allen untersuchten Organen sind diesbezügliche Aussagen nicht eindeutig. Klar und

überraschend konnte hingegen ein Unterschied im Einfluss der einzelnen FcγR auf die CD4 TZD zwischen der Milz und der Peripherie, besonders in den Peyer-Plaques, festgestellt werden.



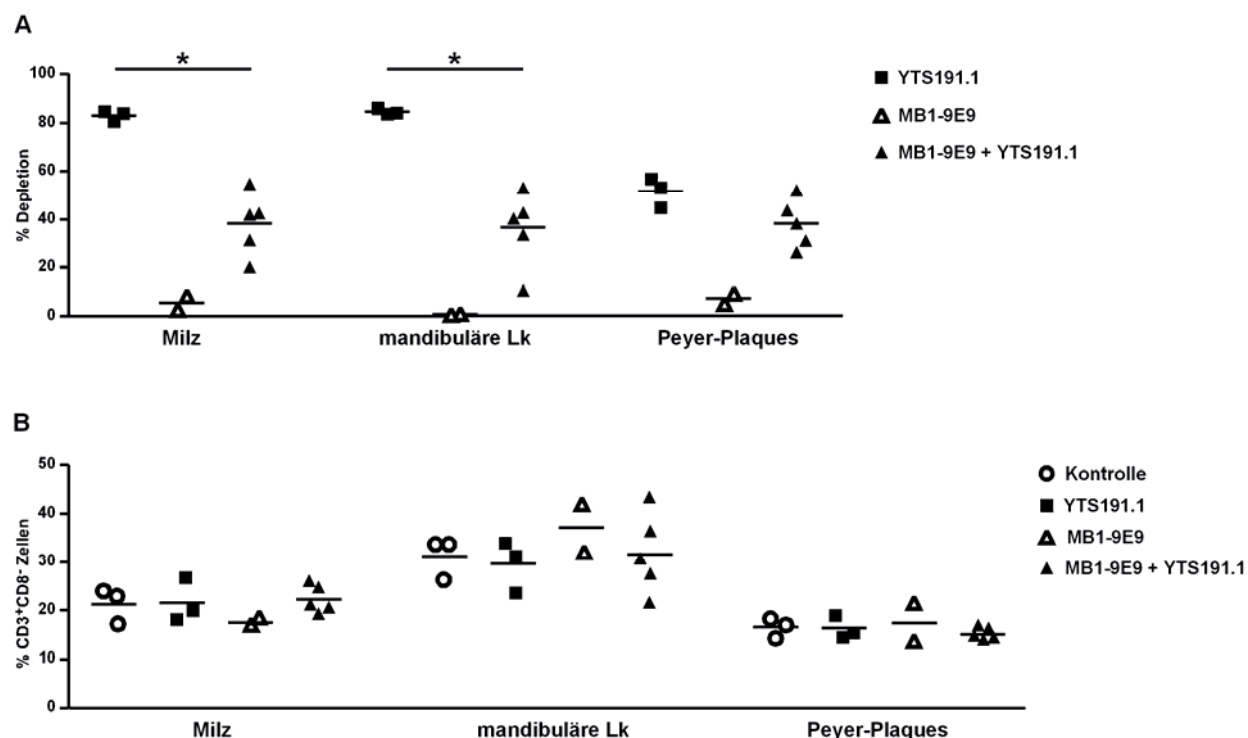
**Abb. 21 Die YTS191.1-induzierte CD4 TZD wird Organ-abhängig von verschiedenen FcγR vermittelt**  
 Berechnete CD4 TZD in Milz (A), mandibulären Lk (B) und Peyer-Plaques (C) 48 h nach YTS191.1-Gabe. Es wurden Wt-Tiere, FcγRI<sup>-/-</sup>, FcγRII<sup>-/-</sup>, FcγRIII<sup>-/-</sup>, FcγRI und III<sup>-/-</sup> und FcRγ<sup>-/-</sup>-defiziente Mäuse analysiert.

### 3.3.4.3 Die CD4 TZD mit YTS191.1 wird durch FcγRIV vermittelt

Da die Reduktion der Depletion durch das Fehlen der gemeinsamen γ-Kette in der Milz und teilweise auch in den Lk im Gegensatz zu den Peyer-Plaques nicht durch den Defekt einzelner oder mehrerer der untersuchten FcγR erklärt werden konnte, wurde im Folgenden der Beitrag des in den bisherigen Analysen fehlenden und jüngsten bekannten Mitglieds dieser Gruppe von Rezeptoren FcγRIV auf die CD4 TZD untersucht. Bis zur Fertigstellung dieser Arbeit waren noch keine FcγRIV-defizienten Tieren generiert



worden. Daher wurde der Rezeptor stattdessen *in vivo* mit 200 µg des anti-FcγRIV mAk MB1-9E9 24 h vor Gabe des depletierenden mAk blockiert. Die Milzen, die mandibulären Lk und die Peyer-Plaques wurden weitere 48 h später entnommen und durchflusszytometrisch analysiert. Wie in Abb. 22 a gezeigt ist, resultierte die Blockade des FcγRIV in einer signifikanten Reduktion der CD4 TZD sowohl in der Milz als auch in den Lk. In den Peyer-Plaques hingegen hatte die Blockade des FcγRIV keinen Effekt auf die CD4 TZD, was mit dem vorher beschriebenen Einfluss der FcγRI und III in diesem Organ korreliert. Der gleiche Versuch wurde zur Kontrolle auch in FcRγ-defizienten Tieren durchgeführt (Abb. 22 b). Im Gegensatz zu den Wt-Tieren blieben die Frequenzen der Zielzellen in den jeweilig untersuchten Organen in allen Gruppen unverändert. Da in den FcRγ-defizienten von vornherein alle aktivierenden FcγR nicht funktionell sind, wurde erstens kein Einfluss der FcγRIV-Blockade auf die CD4 TZD erwartet und zweitens mit diesem Experiment noch einmal gezeigt, dass FcγR tatsächlich die Effektormoleküle der untersuchten Depletion sind.



**Abb. 22** *In vivo* Blockade von FcγRIV reduziert die mAk-vermittelte CD4 TZD in Milz und Lk  
Graphische Darstellung der CD4 TZD nach Blockade des FcγRIV in Wt (A) und FcRγ-defizienten Tieren (B). YTS191.1 wurde 24 h nach Applikation des anti-FcγRIV mAk MB1-9E9 verabreicht und die genannten Organe weitere 48 h später durchflusszytometrisch analysiert.

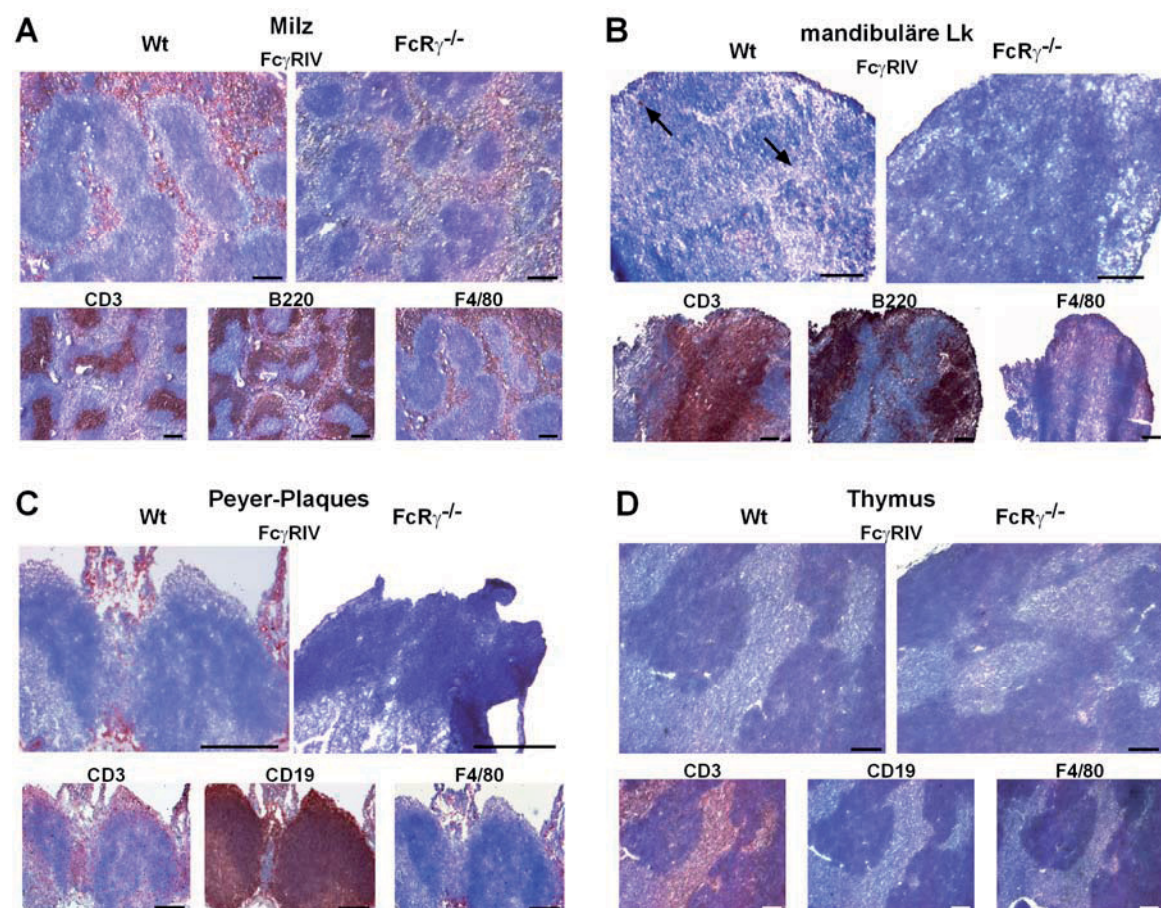
### **3.4 Expression von Fc $\gamma$ RIV im Gewebe und auf Milzzellpopulationen im Ruhezustand**

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist die Depletion der CD4<sup>+</sup> TZ in verschiedenen Organen von verschiedenen Fc $\gamma$ R abhängig. In der Milz und den Lk konnte eine starke Beteiligung des Fc $\gamma$ RIV an der Zielzelldepletion nachgewiesen werden, in den Peyer-Plaques hingegen nicht. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals eine umfassende Analyse der Expression dieses Rezeptors vorgenommen. Es wurde sowohl die Lokalisation von Fc $\gamma$ RIV im Gewebe mittels Immunohistochemie (IHC) untersucht als auch eine, bisher nicht beschriebene, detaillierte durchflusszytometrische Expressionsanalyse auf Zellpopulationsebene durchgeführt.

#### **3.4.1 Fc $\gamma$ RIV ist im Gewebe unterschiedlich stark exprimiert und kolokalisiert mit F4/80-positiven Zellen**

Unimmunisierten Wt- und Fc $\gamma$ R-defizienten Tieren wurden lymphatische und nicht-lymphatische Organe entnommen und daraus serielle Kryoschnitte angefertigt. Diese wurden mit dem anti-Fc $\gamma$ RIV mAk MB1-9E9 angefärbt und durch an die Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase detektiert, wobei AEC als Chromogen eingesetzt wurde. Innerhalb der lymphatischen Gewebe konnte nur in der Milz eine starke Expression des Rezeptors beobachtet werden. Die Fc $\gamma$ RIV<sup>+</sup> Zellen waren außerhalb der weißen Pulpa (TZ- und BZ-Zone sind durch die Färbung mit mAk gegen CD3 bzw. CD19 gekennzeichnet) und der Marginalzone in der roten Pulpa lokalisiert. In dem gleichen Areal befinden sich auch die F4/80<sup>+</sup> Zellen (Abb. 23 a). Im Gegensatz zur Milz konnten in den Lk nur vereinzelt Fc $\gamma$ RIV<sup>+</sup> Zellen beobachtet werden. Auch hier konnten Signale ausschließlich in F4/80<sup>+</sup> Arealen des Organs detektiert werden und nicht in der TZ-oder BZ-Zone (Abb. 23 b). Während in den Peyer-Plaques einige vereinzelte Fc $\gamma$ RIV-Signale nur im Domepithel sichtbar waren, konnte im Thymus keine Expression des Rezeptors detektiert werden (Abb. 23 c, d). Im letztgenannten Organ fehlte auch eine Expression von F4/80. Diese Resultate korrelieren mit der geringeren, von anderen Fc $\gamma$ R abhängigen bzw. fehlenden CD4 TZD in den beiden Organen. Alle nicht-lymphatischen Gewebe (Niere, Leber, Lunge und Dünndarm) wiesen eine starke Fc $\gamma$ RIV-Expression auf

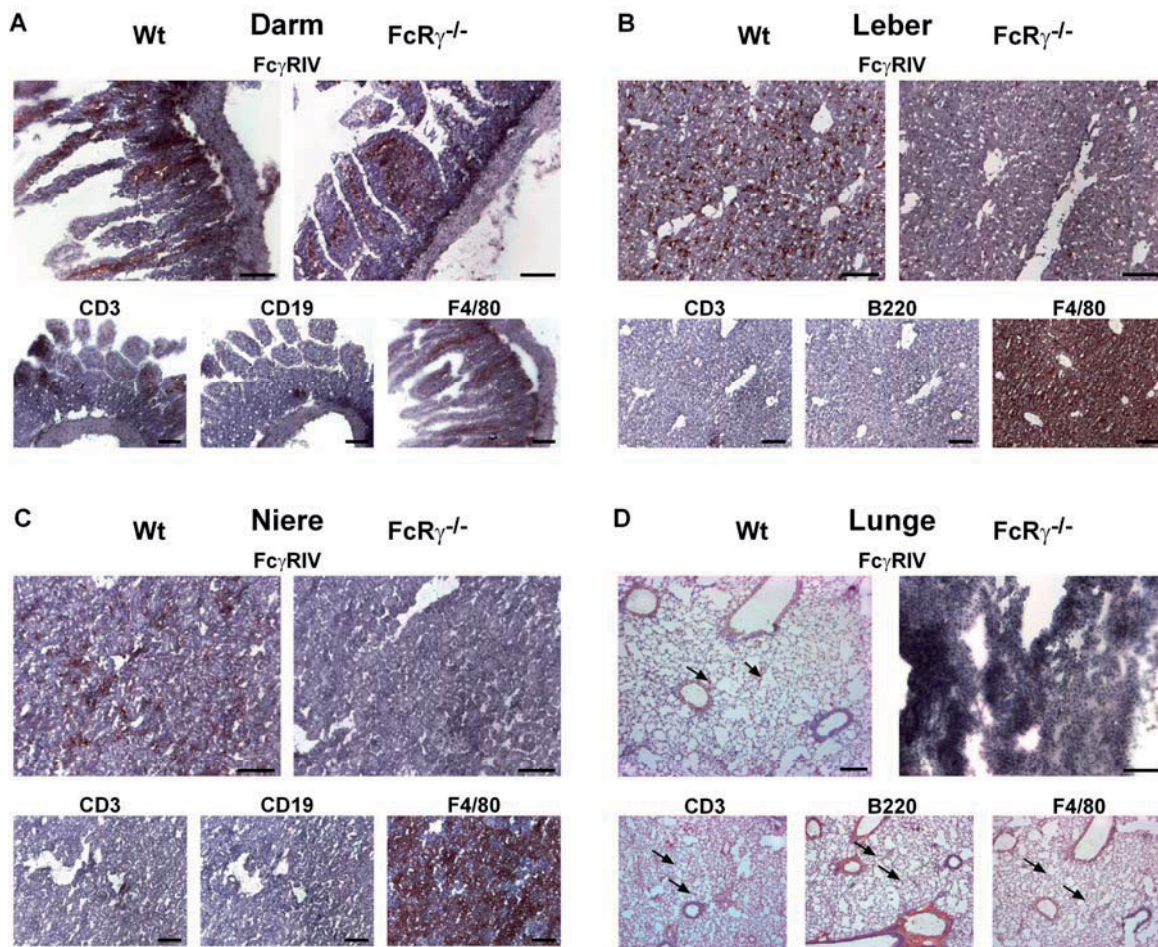
(Abb. 24 a-d). Im Darm lagen die  $\text{Fc}\gamma\text{RIV}^+$  Zellen innerhalb der Darmzotten, in denen auch  $\text{F4/80}^+$  Zellen lokalisiert waren. Die residuale Färbung des mAk auf den Gewebeschnitten der  $\text{FcR}\gamma$ -defizienten Tiere resultierte wahrscheinlich aus der spezifischen Bindung an die  $\alpha$ -Kette des Rezeptors innerhalb der Zellen, die unabhängig vom Fehlen der  $\gamma$ -Kette exprimiert wird. Die fehlende  $\gamma$ -Kette verhindert nur den funktionellen Zusammenbau des Rezeptors auf der Zelloberfläche. Zusammenfassend kann demnach festgehalten werden, dass in allen untersuchten  $\text{Fc}\gamma\text{RIV}$ -exprimierenden Geweben eine Kolokalisation von  $\text{F4/80}^+$  und  $\text{Fc}\gamma\text{RIV}^+$  Zellen in den gleichen Arealen innerhalb der Organe vorliegt.



**Abb. 23**  **$\text{Fc}\gamma\text{RIV}$  wird in lymphatischen Organen differenziell exprimiert**

POD-Färbung der  $\text{Fc}\gamma\text{RIV}$ -Expression auf seriellen Kryoschnitten von Milz (A), Lk (B), Peyer-Plaques (C) und Thymus (D) von Wt- und  $\text{FcR}\gamma$ -defizienten Tieren im Ruhezustand. Die Färbung erfolgte mit mAk gegen  $\text{Fc}\gamma\text{RIV}$ ,  $\text{F4/80}$ ,  $\text{CD3}$  und  $\text{B220}$  bzw.  $\text{CD19}$  (FITC oder Dig-gekoppelt, Sekundärfärbung über anti-FITC-POD oder anti-Dig-POD), die Kernfärbung über Mayers Hämalaun (blau). Der Balken repräsentiert 100  $\mu\text{m}$ . In der Milz konnte eine starke, in den Lk nur eine schwache (Pfeil)  $\text{Fc}\gamma\text{RIV}$ -Expression (rot) detektiert werden. In Thymus und Peyer-Plaques fehlte jede Expression des Rezeptors.



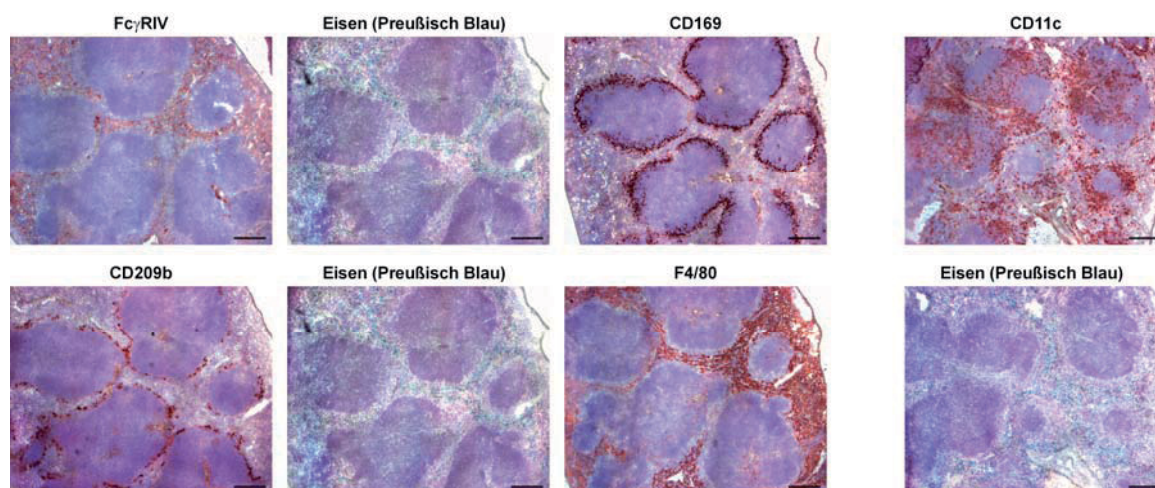


**Abb. 24** **FcγRIV wird in allen nicht-lymphatischen Organen stark exprimiert**  
 POD-Färbung der FcγRIV-Expression auf seriellen Kryoschnitte von Darm (A), Leber (B), Niere (C) und Lunge (D) von Wt- und FcRγ-defizienten Tieren im Ruhezustand. Die Färbung erfolgte mit mAk gegen FcγRIV, F4/80, CD3 und B220 bzw. CD19 (FITC oder Dig-gekoppelt, Sekundärfärbung über anti-FITC-POD oder anti-Dig-POD), die Kernfärbung über Mayers Hämalaun (blau). Der Balken repräsentiert 100 μm. Die Pfeile kennzeichnen einzelne FcγRIV-Signale (rot) in der Lunge.

### 3.4.2 Korrelation der FcγRIV-Expression mit Makrophagen-Markern in der Milz

Die ersten Expressionsdaten für FcγRIV im Gewebe zeigten die Kolo-kalisation des Rezeptors und dem Pan-Makrophagen-Marker F4/80 und legten den Schluss nahe, dass Makrophagen FcγRIV exprimieren könnten. Da in der Milz unter den untersuchten Organen die meisten Makrophagen detektiert werden konnten, wurde in diesem Organ eine weiterführende Analyse von Makrophagen-Subpopulationen auf FcγRIV-Expression mittels IHC durchgeführt. Serielle Kryoschnitte der Milz wurden mit mAks gegen FcγRIV, F4/80, CD169, CD209 und CD11c gefärbt. CD169 (Sialoadhäsion/MOMA-

1/Siglec-1) ist ein Marker für Metallophile Makrophagen der Marginalzone, während CD209 (SIGNR1) von den anderen Makrophagen der Marginalzone exprimiert wird (Hemmi et al., 2009). Da die Milz als Abbauorgan alter oder beschädigter Zellen und Erythrozyten fungiert und Erythrozyten Eisen in Form von Hämoglobin enthalten (Kohyama et al., 2009), wurde zusätzlich endogenes Eisen über die Preußisch-Blau-Reaktion nachgewiesen. Wie in Abb. 25 gezeigt, besteht keine Korrelation von FcγRIV sowohl mit CD169<sup>+</sup> als auch mit CD209<sup>+</sup> Makrophagen. Die Expression von F4/80 und FcγRIV beschränkte sich auf die rote Pulpa, in der auch endogenes Eisen detektiert werden konnte. Eine Ko-Expression des hier untersuchten FcγRIV auf den Eisen enthaltenden Makrophagen kann auf dieser Analyse-Ebene jedoch weder ausgeschlossen noch eindeutig bestätigt werden.



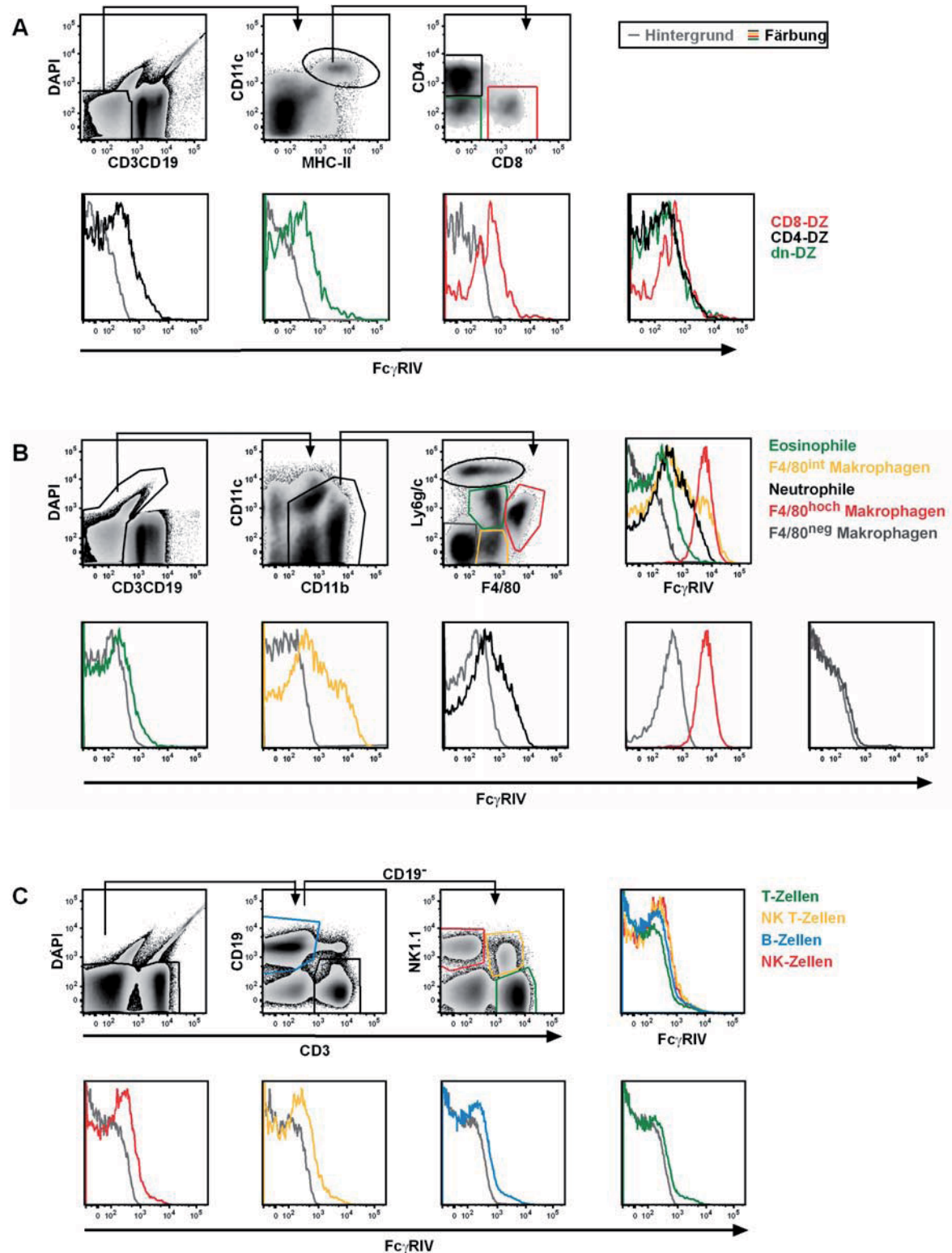
**Abb. 25 Die FcγRIV-Expression kolokalisiert mit F4/80-Expression und endogenem Eisen in der roten Pulpa der Milz**

Immunohistochemische Analyse der Koexpression von FcγRIV und Makrophagen-spezifischen Markern in der Milz im Ruhezustand. Serienschnitte einer Wt-Milz wurden mit mAk gegen FcγRIV, CD11c, F4/80, CD169 und CD209 gefärbt (FITC oder Dig-gekoppelt, Sekundärfärbung über anti-FITC-POD und anti-Dig-POD). Zusätzlich wurde die Eisennachweisende Preußisch-Blau-Reaktion durchgeführt (blau). Kernfärbung erfolgte über Mayers Hämalaun (blau-lila). Der Balken repräsentiert 100 µm.

### 3.4.3 Durchflusszytometrische FcγRIV-Expressionsanalyse auf Milzpopulationen im Ruhezustand

Aufgrund der Lokalisation im Gewebe konnten TZ, BZ als FcγRIV-exprimierende Zellen ausgeschlossen werden. Weiterhin konnte keine Korrelation zwischen Markern für Metallophile und Marginalzonen-Makrophagen und der FcγRIV-Expression festgestellt werden. Um die Ergebnisse der IHC zu verifizieren und darüberhinaus zusätzliche Populationen auf ihre FcγRIV-Expression hin zu untersuchen, wurden Milzzellen von Wt-Mäusen im Ruhezustand durchflusszytometrisch analysiert. Zur Bestimmung der Spezifität des Fluoreszenzsignals wurde jeweils eine kalte Blockade durch Vorinkubation der Zellen mit dem unmarkierten anti-FcγRIV mAk durchgeführt. Insgesamt konnte auf 3-5 % der Milzzellen die Expression von FcγRIV nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Auf DZ konnte mit dem hier verwendeten mAk eine schwache Expression des Rezeptors detektiert werden (Abb. 26 a). Die von Nimmerjahn et al. (2005) beschriebene höhere Expression des Rezeptors auf CD8<sup>+</sup> DZ konnte in dieser Arbeit jedoch nicht reproduziert werden, die DZ-Subpopulationen unterschieden sich untereinander in ihrer FcγRIV- Expressionsstärke nicht. Für die in Abb. 26 b dargestellte Analyse von Granulozyten und Makrophagen auf FcγRIV-Expression wurden die autofluoreszenten Zellen miteinbezogen. In Übereinstimmung mit der Analyse von Gewebsschnitten konnte auch in der Durchfluss-zytometrie (Abb. 26 b) keine Expression des Rezeptors auf F4/80<sup>neg</sup> Makrophagen detektiert werden (graues Histogramm). Im Gegensatz dazu exprimierten F4/80<sup>int</sup> Makrophagen FcγRIV am stärksten. Hierbei wurde eine einheitlich hohe Expression auf F4/80<sup>hoch</sup> Makrophagen beobachtet. Auf F4/80<sup>int</sup> Makrophagen (rotes Histogramm) wurden zwei unterschiedliche Expressionsniveaus des Rezeptor gemessen (gelbes Histogramm), wobei die höhere Expression mit der FcγRIV-Expression der F4/80<sup>hoch</sup> Makrophagen vergleichbar war. Die intermediäre Expressionsstärke entsprach der, die auf Neutrophilen detektierbar war (schwarzes Histogramm). Eosinophile Granulozyten exprimierten FcγRIV auf sehr geringem Niveau (grünes Histogramm). Auf TZ, BZ, NK-Zellen und NK-TZ konnte eine sehr schwache Expression detektiert werden (Abb. 26 c), die mit der auf Eosinophilen vergleichbar ist. Für TZ und BZ sowie Makrophagen konnten damit die Ergebnisse der IHC bezüglich der FcγRIV-Expression bestätigt und darüber hinaus weiter differenziert werden.

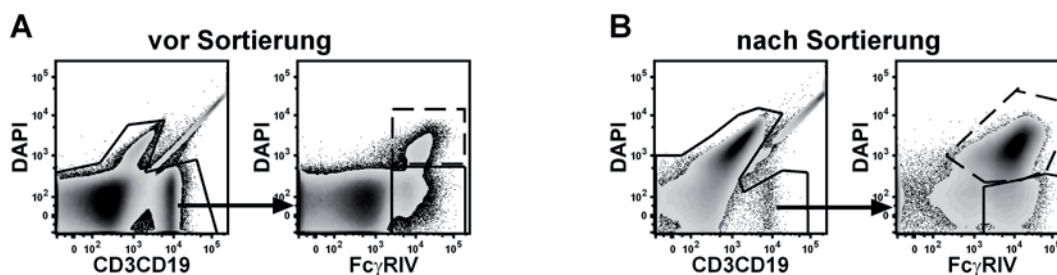




**Abb. 26** Analyse der Fc $\gamma$ RIV-Expression auf verschiedenen Milzpopulationen

Durchflusszytometrische Analyse der Fc $\gamma$ RIV-Expression auf ruhenden Milzzellen. Färbung und Hintergrund-Färbung erfolgte mit dem Dig- bzw. ungekoppelten anti-Fc $\gamma$ RIV mAk MB1-9E9. A) Expression auf DZ (CD3-CD19-MHCII+CD11c+). B) Expression auf Makrophagen und Granulozyten inklusive autofluoreszenter Zellen. C) Expression auf BZ, TZ, NK-TZ und NKZ.

Da die  $\text{Fc}\gamma\text{RIV}^+$  Milzpopulation in einer C57BL/6-Maus mit 3–5 % im Vergleich zu den TZ- oder BZ-Populationen relativ klein ist, ist in Hinsicht auf genügend große Zellzahlen für weiterführende Analysen eine Anreicherung der Zellen unbedingt nötig. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst eine MACS-basierte positive Sortierung der  $\text{Fc}\gamma\text{RIV}^+$  Zellen durchgeführt. Dazu wurden Milzzellen mit anti- $\text{Fc}\gamma\text{RIV}$ -Dig mAk inkubiert und über anti-Dig-Magnetpartikel auf einer magnetisierten Säule zurückgehalten. Nach der Elution der Zellen von der Säule außerhalb des Magnetfeldes wurde die Expression des Rezeptors auf den eluierten Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Wie in Abb. 27 dargestellt ist, konnten  $\text{Fc}\gamma\text{RIV}^+$  Zellen durch die Sortierung stark angereichert werden. Auffällig war die ebenfalls starke Anreicherung autofluoreszenter Zellen ( $\text{DAPI}^+\text{Fc}\gamma\text{RIV}^+$ , gestricheltes Gate) innerhalb der  $\text{Fc}\gamma\text{RIV}^+$  Fraktion.

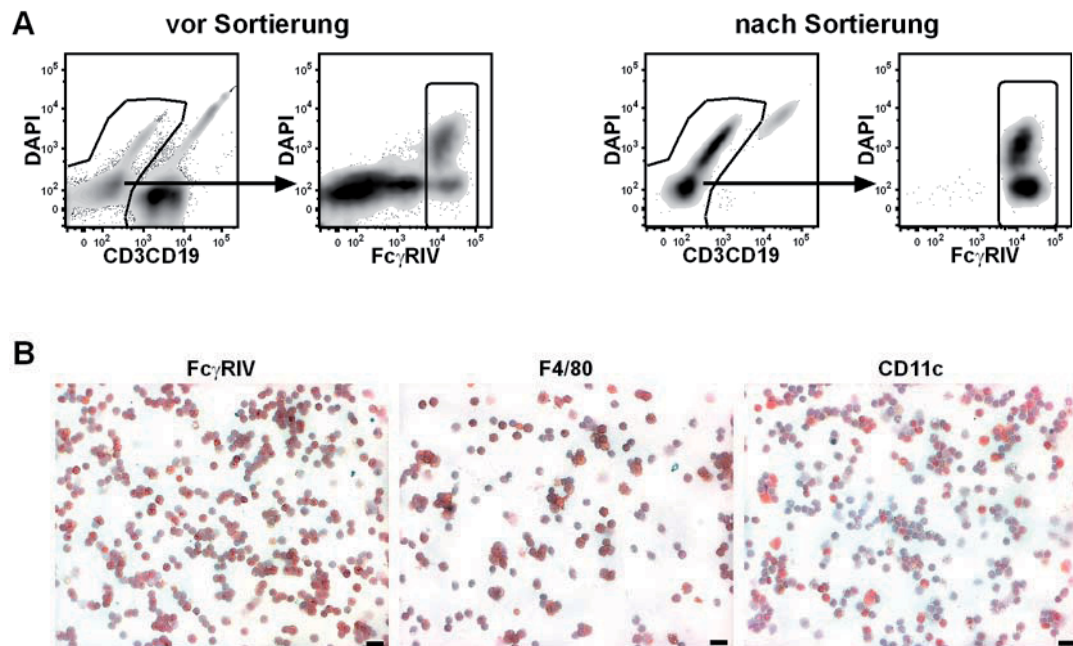


**Abb. 27**     **Positiv magnetisch sortierte  $\text{Fc}\gamma\text{RIV}^+$  Zellen sind teilweise autofluoreszent**  
Durchflusszytometrische Analyse positiv magnetisch sortierter  $\text{Fc}\gamma\text{RIV}^+$  Milzzellen. Die Färbung der Zellen erfolgte mit dem  $\text{Fc}\gamma\text{RIV}$ -spezifischen mAk MB1-9E9 (Dig-gekoppelt), die Sortierung über anti-Dig-Magnetpartikel. Darstellung der CD3- und CD19-Expression im Lebend-Tot-Scatter und der  $\text{Fc}\gamma\text{RIV}$ -Expression A) vor und B) nach der Sortierung.

Als alternative Anreicherungsstrategie zur magnetischen Zellseparation wurde des Weiteren eine Sortierung  $\text{Fc}\gamma\text{RIV}^+$  Zellen mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Milzzellen wurden mit mAk gegen CD3, CD19 bzw.  $\text{Fc}\gamma\text{RIV}$  gefärbt. Tote Zellen ( $\text{DAPI}^+$ ) sowie TZ ( $\text{CD3}^+$ ) und BZ ( $\text{CD19}^+$ ) wurden aus der Analyse ausgeschlossen (Abb. 28 a). Die stark  $\text{Fc}\gamma\text{RIV}^+$  Zellen setzten sich wie schon in Abb. 27 gezeigt aus einer autofluoreszenten und einer nicht-autofluoreszenten Population zusammen und wurden gemeinsam gesammelt. Um die sortierten  $\text{Fc}\gamma\text{RIV}^+$  Zellen weiterhin zu charakterisieren und die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Populationsanalyse zu validieren, wurden die Zellen dann mittels Zentrifugation auf beschichtete Objektträger aufgebracht



(Zytospins) und mittels IHC mit mAks gegen Fc $\gamma$ RIV, CD11c und F4/80 inkubiert. Die Analyse von Zellantigenen auf autofluoreszenten Zellen in der IHC hat gegenüber der Durchflusszytometrie den Vorteil, dass die Autofluoreszenz im Lichtmikroskop nicht detektiert wird und sich nicht störend auf die Analyse auswirkt. Wie in Abb. 28 b deutlich wird, waren die sortierten Zellen nicht nur Fc $\gamma$ RIV<sup>+</sup> sondern teilweise auch F4/80<sup>+</sup> und exprimierten zu einem hohen Anteil CD11c.



**Abb. 28** Fc $\gamma$ RIV<sup>+</sup> Milzzellen exprimieren F4/80 und CD11c  
Immunohistochemische Analyse durchflusszytometrisch auf Fc $\gamma$ RIV-Expression sortierter Milzzellen. A) Sortierung DAPI<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>Fc $\gamma$ RIV<sup>+</sup> Milzzellen unter Einbeziehung autofluoreszenter Zellen. B) IHC-Färbung der sortierten Fc $\gamma$ RIV<sup>+</sup> Zellen mit mAk gegen Fc $\gamma$ RIV, CD11c und F4/80. Kernfärbung mit Mayers Hämalaun (blau). Der Balken repräsentiert 20  $\mu$ m.

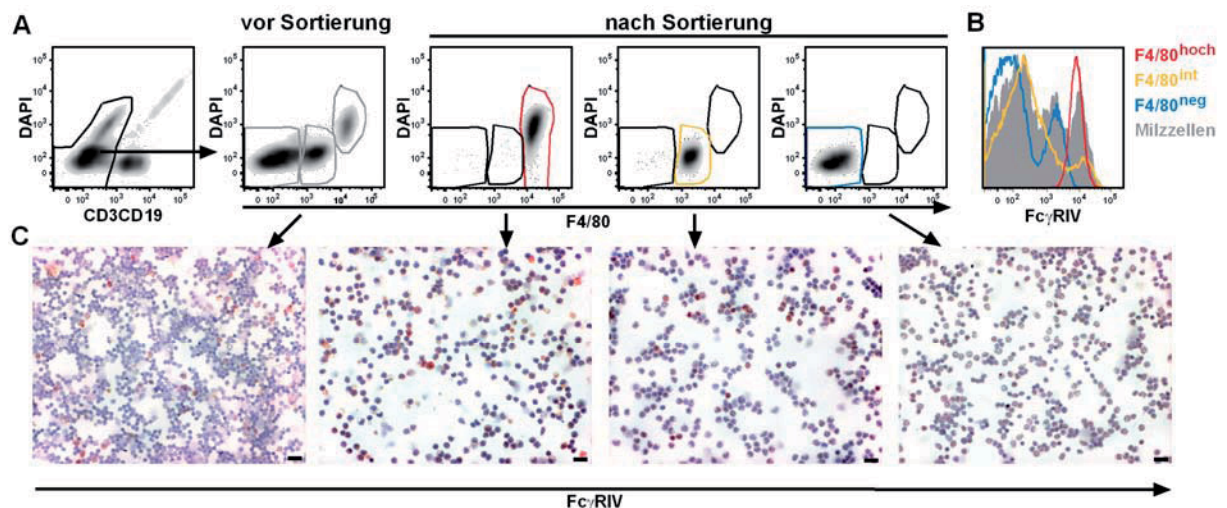
Die Ergebnisse der beiden unabhängigen Sortierungsansätze unterstützen die zuvor in der IHC und der Durchflusszytometrie detektierte Korrelation zwischen der Fc $\gamma$ RIV-Expression auf F4/80<sup>+</sup>, teilweise autofluoreszenten Zellen.

### **3.5 Charakterisierung der potenziellen Effektorzellen der YTS191.1-vermittelten CD4 TZD**

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen konnten eine Abhängigkeit der YTS191.1-vermittelten CD4 TZD von FcγRIV nachweisen, welcher in hohem Maße auf Makrophagen exprimiert wird. Da auch in der Literatur Makrophagen allgemein als Effektorzellen antikörpervermittelter Zielzelldepletion diskutiert werden, wurden im Folgenden FcγRIV<sup>+</sup> Makrophagen als potenzielle Effektorzellen der CD4 TZD weiter charakterisiert.

#### **3.5.1 Durchflusszytometrische Sortierung und Charakterisierung von Makrophagen-Populationen in der Milz**

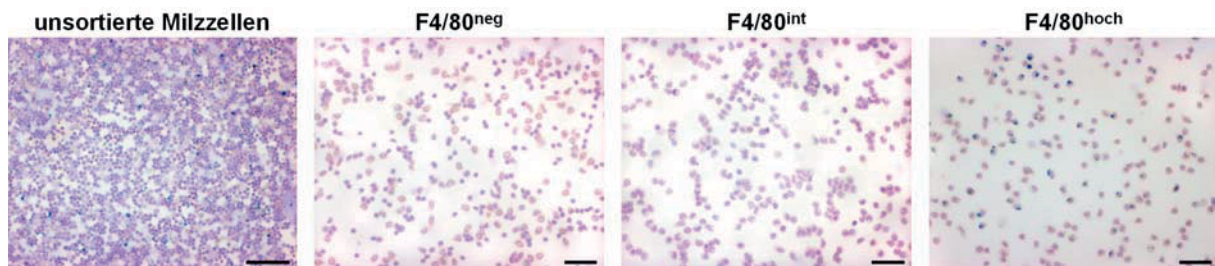
In den Analysen mittels Durchflusszytometrie und IHC von Milzzellen bzw. Milzschnitten konnten unterschiedliche Makrophagen-Populationen bezüglich ihrer F4/80- und FcγRV-Expressionen identifiziert werden. Um die Makrophagen-Subpopulationen weiter zu charakterisieren, wurde eine durchflusszytometrische Sortierung der Zellen auf F4/80-Expression vorgenommen. Wt-Milzzellen wurden dazu mit anti-CD3, anti-CD19 und anti-F4/80 mAk gefärbt und sowohl tote Zellen als auch BZ und TZ während der Sortierung ausgeschlossen, autofluoreszente Zellen jedoch mitsortiert. Vor der Sortierung ließen sich drei Populationen aufgrund ihrer F4/80-Expression unterscheiden, die auch separat gesammelt wurden (Abb. 29 a). Die einzelnen Fraktionen wurden dann sowohl durchflusszytometrisch (Abb. 29 b) als auch in der IHC (Zytospins) (Abb. 29 c) auf ihre FcγRIV-Expression analysiert. Die ausschließlich intermediäre Expression des Rezeptors auf einem Teil der F4/80<sup>neg</sup> Zellen konnte mit beiden Nachweismethoden detektiert werden. Diese sortierte Fraktion setzt sich jedoch nicht nur aus F4/80<sup>neg</sup> Makrophagen zusammen sondern enthält auch NK-Zellen, DZ und Granulozyten. Die F4/80<sup>int</sup> Zellen zeigten eine heterogene Expression des FcγRIV. Auf dem Großteil der Zellen konnte eine schwache bis intermediäre und nur auf einem kleinen Teil der Zellen eine starke FcγRIV-Expression detektiert werden. Die autofluoreszenten, F4/80<sup>hoch</sup> Zellen waren in der Durchflusszytometrie alle, in der IHC zumindest zum Großteil stark FcγRIV<sup>+</sup>.



**Abb. 29** Analyse der FcγRIV-Expression durchflusszytometrisch sortierter F4/80<sup>+</sup> Milzzellen  
FcγRIV-Expression auf sortierten F4/80<sup>+</sup> Milzzellen. Darstellung der durchflusszytometrischen Sortierung (A), und der B) durchflusszytometrischen und C) immunohistochemischen Analyse der FcγRIV-Expression der sortierten Fraktionen. Das grau unterlegte Histogramm bzw. die grauen Kästen repräsentieren die Färbung der unsortierten Milzzellen. Kernfärbung mit Mayers Hämalaun (blau). Der Balken repräsentiert 20 μm.

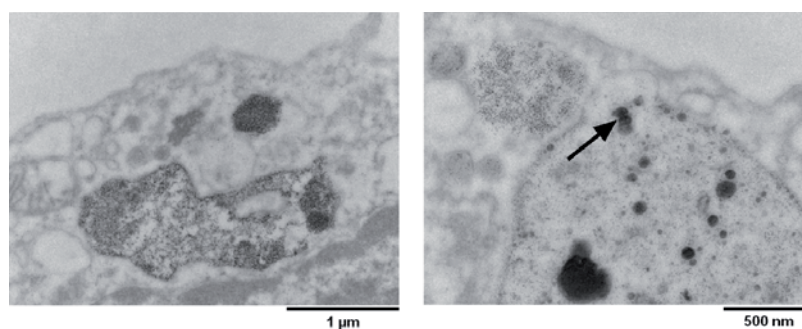
### 3.5.2 Die Autofluoreszenz der F4/80<sup>hoch</sup>FcγRIV<sup>+</sup> Makrophagen korreliert mit der Präsenz endogener Eisen-Partikeln

Wie schon zuvor in dieser Arbeit gezeigt wurde (siehe 3.4.1), konnte Eisen in Milzschnitten mittels Preußisch-Blau-Reaktion als starkes blaues Signal in der roten Pulpa innerhalb der F4/80<sup>+</sup> Zellpopulation nachgewiesen werden. Diese Signale sollten nun den einzelnen, hier charakterisierten Makrophagen-Subpopulationen zugeordnet werden, was bisher in anderen Studien ebenfalls nicht explizit beschrieben worden ist. Die sortierten Fraktionen verschieden stark F4/80-exprimierender Zellen (siehe 3.5.1) wurden daher auf Objektträger aufgebracht und der Eisennachweis durchgeführt. Wie in Abb. 30 zu erkennen ist, konnte Eisen auf ca. 50 % der Zellen der F4/80<sup>hoch</sup> (in der Durchflusszytometrie autofluoreszenten) Zellfraktion detektiert werden, während die F4/80<sup>int</sup> und die F4/80<sup>neg</sup> Fraktion negativ für Eisen war.



**Abb. 30 Endogenes Eisen kann nur in F4/80<sup>hoch</sup> Milzzellen detektiert werden**  
Eisendetektion durch Preußisch-Blau-Färbung (blau) auf durchflusszytometrisch sortierten F4/80-exprimerenden Milzzellen. Die Fraktionen wurden auf Objektträger aufgebracht und gefärbt. Kernfärbung mit Mayers Hämalaun (lila-blau). Der Balken repräsentiert 50 µm.

Darüber hinaus wurden elektronenmikroskopische Analysen der sortierten Fraktionen durchgeführt. Aus Abb. 31 geht hervor, dass in den F4/80<sup>hoch</sup> Zellen viele partikuläre (elektronendichtere) Strukturen in phagosomähnlichen Kompartimenten detektiert werden konnten, die in den anderen Fraktionen fehlten (nicht gezeigt).

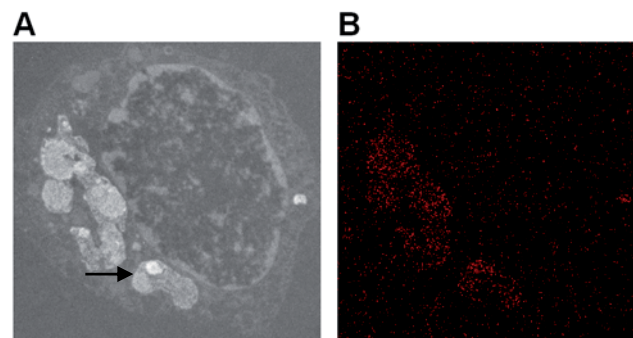


**Abb. 31 F4/80<sup>hoch</sup> Milzzellen enthalten partikelreiche Strukturen**  
Elektronenmikroskopische Darstellung von durchflusszytometrisch sortierten F4/80<sup>hoch</sup> Milzzellen. In den Zellen konnten partikelreiche (Pfeil), phagosomähnliche Kompartimente detektiert werden.

### 3.5.3 Die endogenen Eisenpartikel aggregieren in erythrozytenähnlichen Strukturen innerhalb der F4/80<sup>hoch</sup> Zellen

Um die endogenen Eisen<sup>+</sup> Partikel innerhalb der F4/80<sup>hoch</sup> Makrophagen (Abb. 30 und Abb. 31) näher zu charakterisieren, wurden weitere elektronenmikroskopische Untersuchungen der betreffenden Zellen durchgeführt. In Abb. 32 a ist eine F4/80<sup>hoch</sup> Zelle im Ganzen dargestellt, wobei deutlich erythrozytenähnlich geformte, elektronendichtere Bereiche detektiert werden konnten. Über eine Elementaranalyse derselben Zelle konnten

die elektronendichteren Bereiche eindeutig als eisenhaltig charakterisiert werden (Abb. 32 b). Die Phagozytose von Erythrozyten durch Zellen der roten Pulpa in der Milz ist in der Literatur hinreichend beschrieben (Kohyama et al., 2009). In dieser Arbeit ist es jedoch gelungen, diese bereits bekannten, erythrozytenphagozytierenden Zellen mit mehreren unabhängigen Methoden eindeutig zu identifizieren und als  $F4/80^{\text{hoch}}$ , autofluoreszent und über ihre hohe  $Fc\gamma RIV$ -Expression als potenzielle Effektorzellen der CD4 TZD weiter zu charakterisieren. Da alle  $F4/80^{\text{hoch}}$  Zellen gleichzeitig autofluoreszent und  $Fc\gamma RIV^+$  sind, liegt ihr Anteil innerhalb einer Milz bei ca. 0,7-1,2 %. Der Eisennachweis über die Preußisch-Blau-Färbung ist zwar nur für die Hälfte der Zellen positiv (Abb. 30), was möglicherweise aber einzig durch die Sensitivität der Detektion (Lichtmikroskop) bedingt ist.



**Abb. 32**  **$F4/80^{\text{hoch}}$  Milzzellen enthalten Eisen in erythrozytenähnlichen Strukturen**  
Durchflusszytometrisch sortierte  $F4/80^{\text{hoch}}$  Milzzellen wurden elektronenmikroskopisch auf ihren Eisen-Gehalt analysiert. A) Darstellung einer ganzen Zelle mit erythrozytenähnlich geformten Strukturen (Pfeil). B) Elementaranalyse auf Eisen (rot) derselben Zelle.

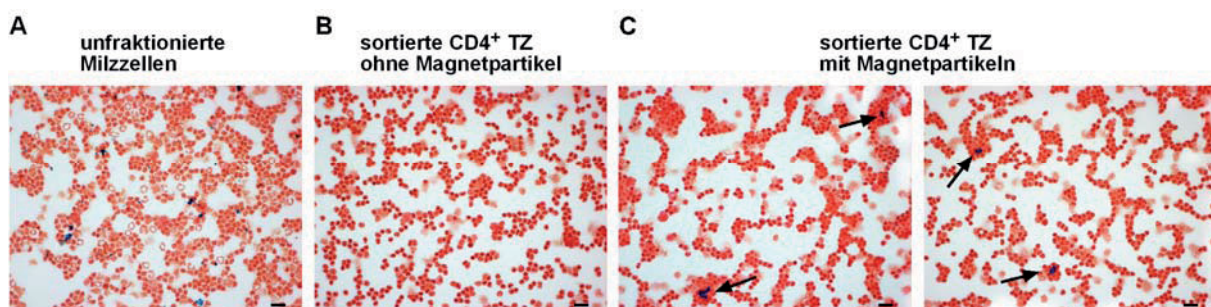
### 3.6 Visualisierung der YTS191.1-vermittelten CD4 TZD *in vivo* in der Milz

Ein weiterer Schritt zur Analyse der CD4 TZD war in dieser Arbeit der direkte Nachweis entweder der Zielzellen in Kontakt mit oder innerhalb der Effektorzellen. Für die Visualisierung der Zielzellen musste zunächst ein geeignetes Reagenz gefunden werden, das biologisch stabil und nicht-toxisch ist. In dieser Arbeit wurden hierfür Magnetpartikel und CFSE verwendet.



### 3.6.1 Magnetpartikel sind für Markierung von Zellen geeignet

An Antikörper gekoppelte Magnetpartikel werden in der Zellsortierung routinemäßig eingesetzt. Bisher sind keine negativen Einflüsse beschrieben worden, wenn Zellen mit Magnetpartikeln an der Zelloberfläche in weiterführenden Analysen eingesetzt wurden. Der kritische Punkt der Verwendung von Magnetpartikeln für die Markierung von Zellen ist daher die spätere Detektierung der Partikel im Gewebe oder in Zellsuspensionen. In der Elektronen-mikroskopie konnten die Partikel eindeutig dargestellt werden (siehe Abb. 11) und aufgrund ihrer Größe können sie klar von den endogenen Partikeln unterschieden werden (Daten nicht gezeigt). Um die Detektierbarkeit magnetpartikelmarkierter Zellen in der IHC zu testen, wurde die Preußisch-Blau-Reaktion angewendet.  $CD4^+$  Milzzellen wurden negativ magnetisch sortiert, und bei 4 °C für 20 min mit unterschiedlichen Konzentrationen von Magnetpartikeln beladen. Anschließend wurden die Zellen auf Objektträger aufgebracht und der Eisennachweis durchgeführt. Wie aus Abb. 33 a, c hervorgeht, konnten die verwendeten Magnetpartikel als blaue Signale spezifisch in unsortierten und mit Magnetpartikeln beladenen sortierten Zellen detektiert werden. In der Zellfraktion ohne Magnetpartikel fehlen diese Signale (Abb. 33 b). Die magnetischen Partikel konnten in allen Inkubationsverhältnissen (bis zu 1:40, nicht gezeigt) nachgewiesen werden.

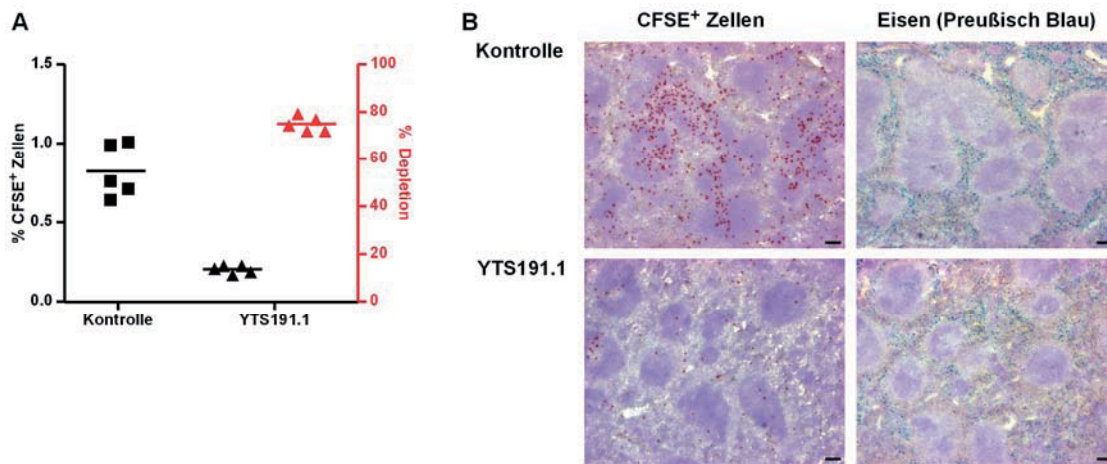


**Abb. 33**      **Magnetpartikelbeladene Zellen können mittels IHC nachgewiesen werden**

Nachweis von Eisen (blau) mittels Preußisch-Blau-Färbung in unsortierten Milzzellen und negativ sortierten  $CD4^+$  TZ mit oder ohne Beladung mit unterschiedlichen Mengen an Magnetpartikeln bei 4 °C. Zellkerne wurden mit Neutral-Rot gefärbt, der Balken repräsentiert 20  $\mu$ m. A) Positivkontrolle für Eisennachweis mit unsortierten Milzzellen. B) Negativkontrolle auf sortierten  $CD4^+$  TZ ohne Magnetpartikel. C) Färbung auf sortierten  $CD4^+$  TZ mit Magnetpartikeln in zwei verschiedenen Inkubationsverhältnissen (1:5 und 1:10). Die Partikel (Pfeil) konnten bis zu einer Verdünnung von 1:40 (nicht gezeigt) detektiert werden.

### 3.6.2 Verwendung von Magnetpartikeln im Modell der CD4 TZD

Nachdem Magnetpartikel in dieser Arbeit sowohl elektronenmikroskopisch als auch immunohistochemisch detektiert werden konnten, wurden diese Partikel im Folgenden *in vivo* eingesetzt. Sortierte CD4<sup>+</sup> TZ wurden zur späteren Detektion mit CFSE markiert, 1 h bei 37 °C mit anti-CD4-Magnetpartikeln (nicht sättigend) inkubiert und in Rezipienten-Mäuse transferiert. 24 h später wurde der depletierende mAk verabreicht und nach weiteren 48 h die Milzen sowohl immunohistochemisch als auch durchflusszytometrisch auf die Frequenz der transferierten Zellen hin analysiert. Die Internalisierung der Partikel *in vivo* (FcγR-haltige Umgebung) zum Zeitpunkt der mAk-Gabe wurde aufgrund früherer Experimente (Kapitel 3.1.4) vorausgesetzt. In Abb. 34 a sind sowohl die Frequenz als auch die Depletionseffizienz der Zielzellen dargestellt. In der mAk-behandelten Gruppe wurden die Zielzellen signifikant um 70–80 % reduziert, was sich auch in der immunohistochemischen Analyse widerspiegelte (Abb. 34 b). Die Anzahl CFSE<sup>+</sup> Zellen war in der mAk-behandelten Gruppe deutlich geringer als in der Kontrollgruppe. Der Eisennachweis war in beiden Gruppen ebenfalls positiv. Wie schon in Abb. 25 gezeigt wurde, enthält die Milz jedoch bereits endogenes Eisen, so dass eine Quantifizierung der transferierten Zellen über die Magnetpartikel schon aus diesem Grund nicht möglich war. Darüber hinaus wird deutlich, dass die hier durchgeführte Magnetpartikelbeladung für die Detektion jeder einzelnen transferierten Zelle nicht geeignet ist. Bereits in der Kontrollgruppe korreliert die Anzahl der CFSE<sup>+</sup> Zellen, die vor allem in der weißen Pulpa lokalisierten, nicht mit der Anzahl der Eisen-Signale in diesem Areal. In der mAk-behandelten Gruppe konnten zwar deutlich weniger CFSE<sup>+</sup> Zielzellen detektiert werden, eine Zunahme der Eisen-Signale in der roten Pulpa als Sitz der potenziellen Effektorzellen war jedoch nicht zu erkennen.



**Abb. 34 Die Detektion von Magnetpartikeln mittels IHC im Modell der CD4 TZD ist ungenügend**

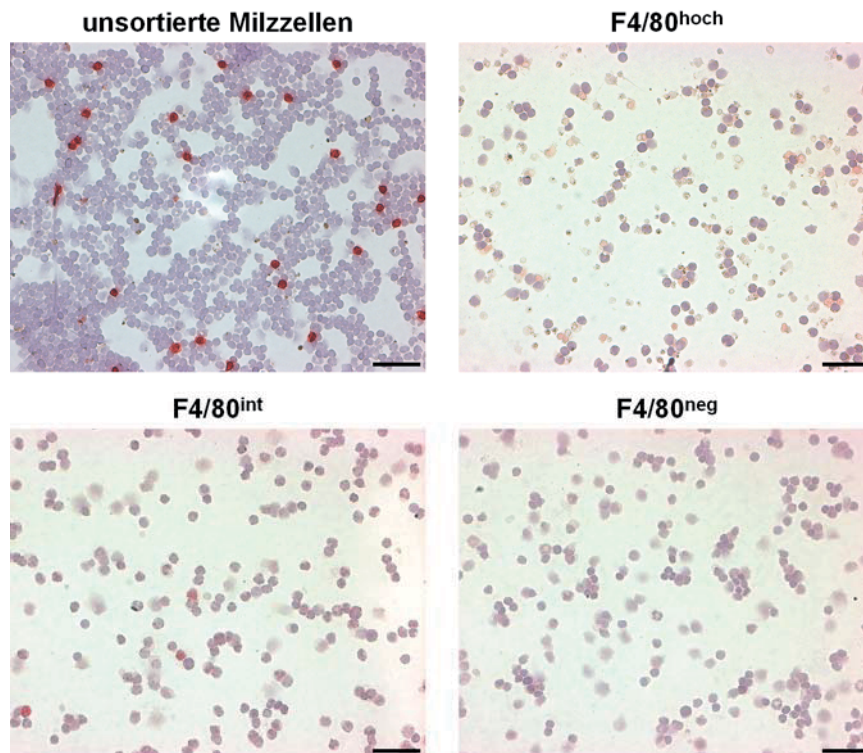
Immunohistochemische und durchflusszytometrische Analyse von sortierten CD4<sup>+</sup> TZ, die CFSE-markiert, mit anti-CD4-Magnetpartikel-beladen und transferiert wurden. Die Analyse der Milz erfolgte 48 h nach mAk-Gabe. A) Darstellung der Frequenz und der berechneten Depletion der Zielzellen. B) Nachweis der Zielzellen über CFSE durch anti-FITC-POD (rot) und über Eisen (blau) durch die Preußisch-Blau-Reaktion auf seriellen Milzschnitten der Kontrollgruppe (oben) und der mAk-behandelten Gruppe (unten). Kernfärbung erfolgte mit Mayers Hämalan (lila-blau). Der Balken repräsentiert 100  $\mu$ m.

Da der Nachweis der Magnetpartikel mittels IHC qualitativ aber nicht quantitativ möglich war, wurde die Elektronenmikroskopie als alternative Analysestrategie gewählt. Das zuvor beschriebene Experiment wurde bis zum Transfer und der Depletion der Zellen wiederholt, die Milzzellen anschließend aber durchflusszytometrisch auf F4/80-Expression sortiert (siehe 3.5.1). In den resultierenden Fraktionen wurden dann die Magnetpartikel elektronen-mikroskopisch lokalisiert. F4/80<sup>neg</sup> und F4/80<sup>int</sup> Zellen sowohl aus mAk-behandelten Tieren oder der Kontrollgruppe waren negativ für partikuläres Eisen (Daten nicht gezeigt). Nur in den F4/80<sup>hoch</sup> Zellen konnte Eisen detektiert werden. Allerdings gab es keine quantitativen Unterschiede zwischen der Anzahl der Partikel in der F4/80<sup>hoch</sup>-Fraktion der Kontrollgruppe und der mAk-behandelten Gruppe (nicht gezeigt), und die Eisenpartikel entsprachen in ihrer Größe den endogenen Ferritin-Partikeln. Die transferierten Magnetpartikel konnten daher entgegen aller Erwartungen in keiner der untersuchten Fraktionen nachgewiesen werden.



### 3.6.3 CFSE kann nicht innerhalb von phagozytierenden Zellen nachgewiesen werden

Die CFSE-Markierung von Zellen ist neben der Beladung mit Magnetpartikeln eine weitere Möglichkeit, um Zellen *in vivo* zu verfolgen und wird oft in Proliferationsstudien angewandt. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode eingesetzt, um die Phagozytose der Zielzellen zu testen. 24 h nach dem Transfer sortierter, CFSE-markierter CD4<sup>+</sup> TZ wurde den Rezipiententieren der depletierende mAk injiziert und nach weiteren 18 h die Milzen durchflusszytometrisch auf die Frequenz der Zielzellen hin analysiert. Positiv auf Depletion getestete Milzen wurden dann vereinigt und durchflusszytometrisch auf F4/80-Expression sortiert. Die sortierten Fraktionen wurden dann auf Objektträger aufgebracht und immunohistochemisch auf das Vorhandensein von CFSE gefärbt. In Abb. 35 ist nur die Färbung der sortierten Makrophagen-Fraktionen der Kontrollgruppe dargestellt, weil im Vergleich zu den Fraktionen der mAk-behandelten Gruppe keine Unterschiede festgestellt werden konnten. In unsortierten Milzzellen konnten nicht-depletierte CFSE<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> TZ durch ihre starke CFSE-Färbung eindeutig detektiert werden. In den F4/80<sup>hoch</sup> Fraktionen fanden sich einige schwach CFSE<sup>+</sup> Zellen, während in den F4/80<sup>neg</sup> Fraktionen kein CFSE detektiert werden konnte. Die CFSE-Signale in den F4/80<sup>int</sup> Fraktionen waren zwar schwächer als in den unsortierten Zellen, konnten aber aufgrund ihrer Morphologie eindeutig CD4<sup>+</sup> TZ zugeordnet werden. CFSE-Signale waren also bereits in den sortierten F4/80-Fraktionen der Kontrollgruppe detektierbar und es konnte weder ein Unterschied zur Depletionsgruppe festgestellt noch eine Lokalisation von CFSE innerhalb von phagozytierenden Zellen nachgewiesen werden. Die Markierung von Zellen mit CFSE oder Magnetpartikeln erwies sich in dem hier untersuchten *in vivo*-Modell der CD4 TZD also trotz positiver Ergebnisse zur Detektion der Zellen *in vitro* als nicht geeignet zur Bestimmung des Verbleibs der Zielzellen *in vivo*.



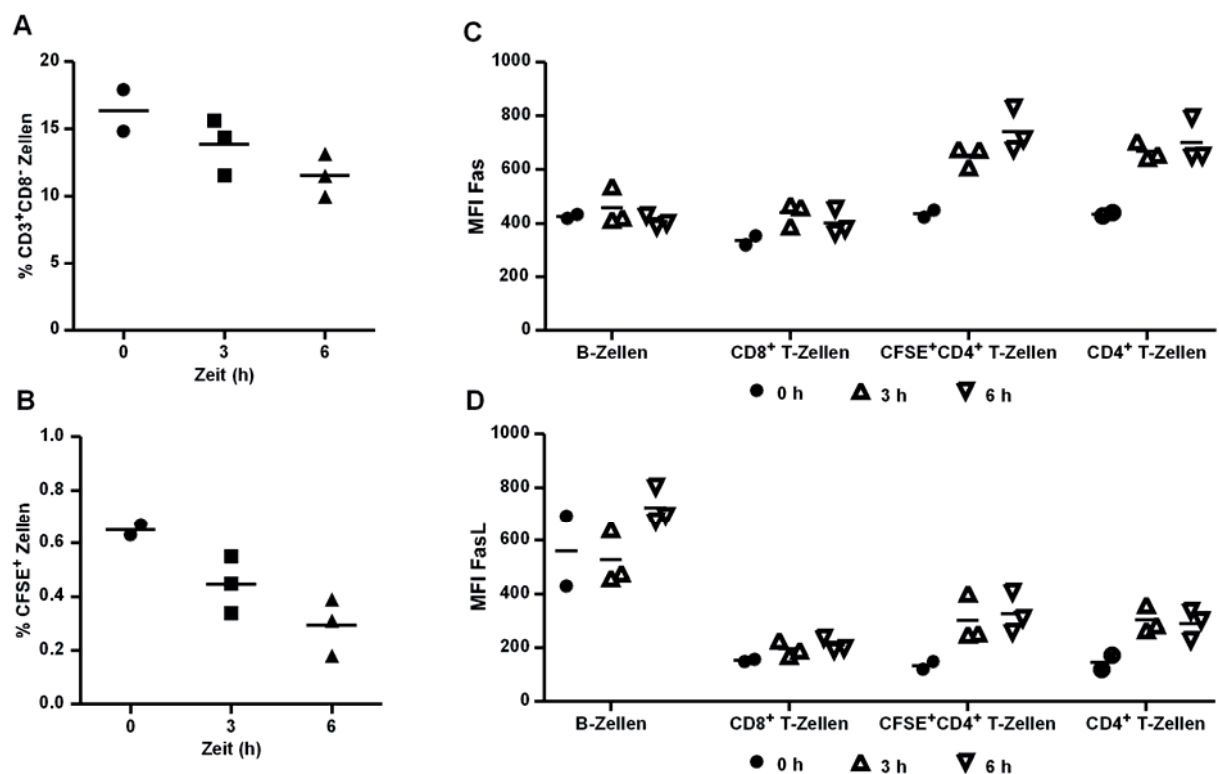
**Abb. 35** **CFSE kann innerhalb von F4/80-exprimierenden Zellen nicht nachgewiesen werden**  
 Immunohistochemischer Nachweis von CFSE auf Zytospins von sortierten, F4/80-exprimierenden Milzzellfraktionen. Sortierte CFSE<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> TZ wurden in Rezipientenmäuse transferiert, 24 h später wurde den Tieren PBS oder der anti-CD4 mAk YTS191.1 verabreicht. 18 h nach PBS-Gabe (YTS191.1 behandelte Zellen nicht dargestellt) wurden die Milzen entnommen, die Zellen durchflusszytometrisch auf F4/80-Expression sortiert und auf Objektträger aufgebracht. CFSE wurde mit anti-FITC-POD (rot), Zellkerne mit Mayer's Hämalaun (lila) gefärbt, der Balken repräsentiert 50 µm.

### 3.7 Apoptose als möglicher Mechanismus der YTS191.1-vermittelten CD4 TZD

In dieser Arbeit wurde ebenfalls getestet, ob die Depletion der Zielzellen in diesem Modell allein über eine Fcγ-Rezeptor-vermittelte Phagozytose durch Makrophagen herbeigeführt wurde, oder ob eventuell zielzellintrinsische Mechanismen einen Beitrag leisten. In diesem Zusammenhang wird in der Literatur (Jamali et al., 1992; Newell et al., 1990; Oyaizu et al., 1997) eine Apoptose-Induktion nach Ligation des CD4-Moleküls diskutiert, wobei sowohl die Fas-FasL-Interaktion als auch Caspasen als mögliche Mechanismen genannt werden.

### 3.7.1 Nach mAk-Gabe wird die Expression von Fas und FasL induziert

Um den Beitrag von Apoptose-Mechanismen an der Depletion der Zielzellen zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die Apoptose über Signale des Fas-FasL-Systems analysiert. 24 h nach dem Transfer sortierter CFSE-markierter  $CD4^+$  TZ wurde den Rezipienten-Mäusen YTS191.1 injiziert und verschiedene Milzpopulationen zu den angegebenen Zeitpunkten durchflusszytometrisch auf Expression von Fas und FasL analysiert. Wie in Abb. 36 dargestellt, konnte bereits nach 6 h eine signifikante Reduktion sowohl der endogenen als auch der transferierten Zellen festgestellt werden. Darüber hinaus nahm die Expression von Fas und FasL sowohl auf endogenen als auch auf transferierten  $CD4^+$  TZ über die Zeit zu, während auf endogenen BZ und  $CD8^+$  TZ keine signifikante Änderung der Fas-Expression zu detektieren war. Diese Ergebnisse deuten eine mögliche Beteiligung des Fas-FasL-Systems an der  $CD4$  TZD an.

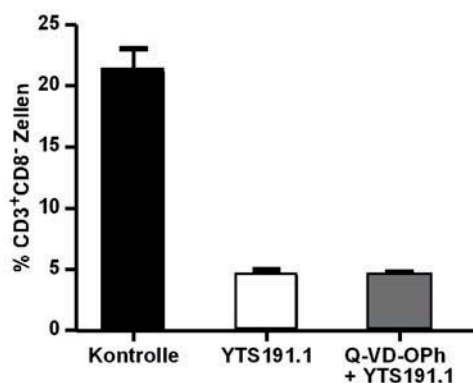


**Abb. 36 Analyse der Fas- und FasL-Expression im Modell der  $CD4$  TZD**

Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse der A) Frequenz endogener Zielzellen und B) transferierter CFSE<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> TZ und der Expression von C) Fas und D) FasL auf den BZ, CD8<sup>+</sup> TZ und CD4<sup>+</sup> TZ in der Milz zu den angegebenen Zeitpunkten nach Gabe von YTS191.1.

### 3.7.2 Die CD4 TZD wird durch Einsatz eines Pan-Caspase-Inhibitors nicht beeinflusst

An apoptotischen Prozessen *in vivo* sind viele verschiedene Moleküle wie Rezeptoren und ihre Liganden, Signal-Transmitter, pro- und anti-apoptotische Proteine und Caspasen beteiligt (Krammer et al., 2007). Caspasen sind als Regulatoren und Exekutoren in den meisten apoptotischen Prozessen involviert. Daher wurde in einem weiteren Experiment die Rolle von Caspasen in der mAk-vermittelten CD4 TZD untersucht. C57BL/6-Wt-Mäusen wurden je 2 h vor und 24 h nach mAk-Gabe 0,4 mg des Pan-Caspase-Inhibitors Q-VD-OPH verabreicht. 48 h nach mAk-Gabe wurden die Milzen durchflusszytometrisch analysiert. Wie in Abb. 37 zu sehen ist, war die Reduktion der Zielzellen in beiden Gruppen mit oder ohne Caspase-Inhibitor vergleichbar. Basierend auf diesen Ergebnissen konnte keine grundlegende Beteiligung von Caspasen in dem untersuchten Modell der CD4 TZD nachgewiesen werden.

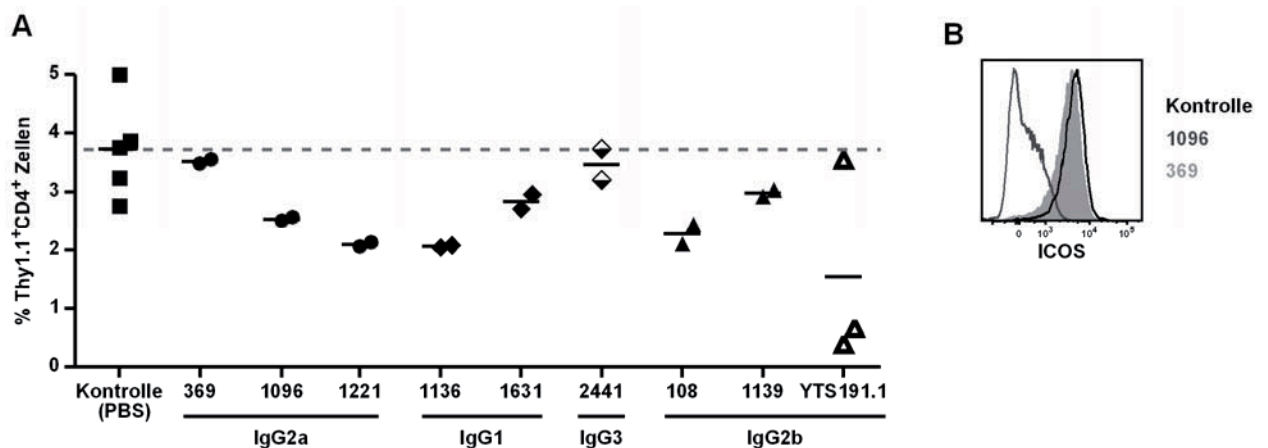


**Abb. 37** Der Pan-Caspase-Inhibitor Q-VD-OPH hat keinen Einfluss auf die CD4 TZD *in vivo*  
Darstellung der durchflusszytometrisch ermittelten Frequenz der Zielzellen in der Milz 48 h nach mAk-Gabe. Der Pan-Caspase-Inhibitor Q-VD-OPH wurde 2 h vor und 24 h nach mAk-Gabe verabreicht.

### 3.8 Die mAk-vermittelte Zelldepletion ist vom Ziel-Molekül abhängig

Die an der CD4 TZD beteiligten Faktoren und potenziellen Effektorzellen konnten in der vorliegenden Arbeit sehr detailliert ermittelt werden. Um zu testen, ob die Depletion anderer Zielzellen mit der CD4 TZD vergleichbar ist, wurde die Depletion von ICOS<sup>+</sup> TZ untersucht. C57BL/6-Wt-Mäuse wurden 24 h nach dem Transfer Ova-TZR-transgener

OT-II-Zellen mit je 2 mg löslichem Ova und 10 µg LPS für 48 h immunisiert. Wie bereits in Abb. 18 a gezeigt, ist zu diesem Zeitpunkt die durch die Aktivierung induzierte ICOS-Expression maximal. Um die Ergebnisse mit der CD4 TZD vergleichen zu können, wurden sowohl eine Reihe von anti-ICOS mAk mit den murinen Immunglobulinisotypen IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3, als auch YTS191.1 zu je 100 µg injiziert. 48 h später wurde die Frequenz der transgenen Zellen und ihre ICOS-Expression in der Milz analysiert. Aus Abb. 38 a geht hervor, dass nur in YTS191.1-behandelten Tieren die Zahl der Zielzellen stark reduziert wurde. Die maximale Reduktion der Zielzellen in den mit anti-ICOS mAk-behandelten Tieren betrug 50 %. Der Isotyp der verabreichten anti-ICOS mAk schien keinen Einfluss auf die Wirkung *in vivo* zu haben, da mit allen Isotyp-Klassen außer IgG3 die maximale Zielzellreduktion erreicht wurde. In Abb. 38 b ist die ICOS-Expression auf Zellen einiger anti-ICOS mAk-behandelter Tiere dargestellt. Auf Zellen der Kontrollgruppe konnte eine hohe ICOS-Expression detektiert werden, die fast mit der auf mAk 369-behandelten, nicht reduzierten Zellen vergleichbar war. Nach Gabe von mAk 1096 konnte jedoch nur noch eine stark reduzierte ICOS-Expression gemessen werden, wobei jedoch nicht beurteilt werden kann, ob dies auf der Blockade des Moleküls durch den injizierten mAk, auf der Internalisierung des Moleküls ähnlich wie bei CD4 oder einer anderen Modulation beruht.



**Abb. 38** Im Vergleich zur CD4 TZD werden ICOS<sup>+</sup> Zellen maximal zu 50 % reduziert  
Durchflusszytometrische Analyse der A) Frequenz und der B) ICOS-Expression transferierter Ova-TZR-transgener CD4<sup>+</sup> TZ 48 h nach Gabe von anti-ICOS mAk bzw. YTS191.1 in der Milz.

## 4 Diskussion

Monoklonale Antikörper (mAk) sind potente Hilfsmittel in der Therapie von Immunkrankheiten, wobei die zugrunde liegenden Wirkmechanismen der mAk nicht vollständig geklärt sind. Prinzipiell wirken mAk entweder durch die Blockade eines natürlichen Interaktionspartners, durch die gezielte Signalsetzung in Abwesenheit des natürlichen Liganden, oder durch die Beseitigung (Depletion) der Zielzellen aus dem Organismus. In der vorliegenden Arbeit wurden die Parameter einer mAk-vermittelten Depletion am Beispiel der  $CD4^+$  T-Zelldepletion (CD4 TZD) sowohl in Bezug auf die daran beteiligten Organe, Moleküle und Effektorzellen als auch in Hinsicht auf den Zeitverlauf und den potenziellen Mechanismus untersucht.

### 4.1 Evaluierung des etablierten *in vivo*-Modells der CD4 TZD

Das in dieser Arbeit etablierte CD4 TZD-Modell ist durch die einmalige i.p.-Gabe von 100  $\mu$ g YTS191.1 und die bisher nicht publizierte umfassende Analyse der Zielzelldepletion sowohl in der Milz, den Lk und den Peyer-Plaques als auch im Thymus charakterisiert. Die hier verwendete Definition der Zielzellen als  $CD8^-$  TZ berücksichtigt einerseits die im folgenden diskutierte Modulation des untersuchten Zielmoleküls und erleichtert darüber hinaus den Vergleich mit bereits publizierten Daten.

#### 4.1.1 Die CD4 TZD beginnt erst 6 h nach mAk-Behandlung

In dieser Arbeit konnte bereits ab 6 h nach der Applikation von YTS191.1 eine stetige Abnahme der Zielzellzahl in der Milz, den Lk und darüber hinaus auch den Peyer-Plaques beobachtet werden (Abb. 8, Abb. 9). In der Literatur finden sich jedoch Hinweise darauf, dass sich die hier etablierte Kinetik der CD4 TZD aus den folgenden zwei ineinander greifenden Prozessen zusammensetzt: der Emigration von Zielzellen aus den untersuchten Organen und dem tatsächlichen Entfernen der Zellen aus dem Organismus. Wang et al. (1994) beobachteten zunächst während der ersten 6 h nach mAk-Gabe eine Auswanderung der  $mAk^+$  Zellen aus den Organen (Milz und Lk) ins Blut. Eine wirkliche



Depletion der Zellen postulierten sie erst ab 6–24 h nach mAk-Gabe, wenn im Blut normale Lymphozytenzahlen gemessen werden konnten, während sie in den untersuchten Organen weiter abnahmen. Diese Befunde deuten auf eine zu diesem Zeitpunkt stattfindende Einwanderung der Zellen aus dem Blut in die depletierenden Organe wie Milz und Leber (Huang et al., 1994; Yousaf and Williams, 1999) hin. Die frühe Phase der Zelldepletion sollte daher bei mAk-basierten Therapien und Untersuchungen berücksichtigt werden, da die Zielzellen immer noch im Organismus vorhanden und möglicherweise funktionell sind, obwohl sie in bestimmten Organen nicht mehr detektiert werden können.

#### **4.1.2 Die Analyse der CD4 TZD wird durch die CD4-Modulation nach Bindung eines mAk beeinflusst**

Zusätzlich zur Problematik der Analyse und Interpretation der Depletion zu frühen Zeitpunkten sollte in einer mAk-vermittelten Zelldepletion das Verhalten des Zielmoleküls über die Zeit beachtet werden. Wie im Verlauf der CD4 TZD sowohl in dieser Arbeit als auch in anderen Studien (Jamali et al., 1992; Wofsy et al., 1985) beobachtet wurde, wird CD4 nach Applikation eines anti-CD4 mAk in vivo auf der Zelloberfläche moduliert (Abb. 7, Abb. 10). Unabhängig vom Mechanismus der CD4-Modulation (unter 4.2.3.1 diskutiert) wurde durch die sorgfältige Analyse der Zielzellpopulation, hier als  $CD3^+CD8^-$  definiert, deutlich, dass die Modulation bei der Analyse der CD4 TZD berücksichtigt werden muss. Beispielsweise konnte die von Howie et al. (1994) beobachtete präferenzielle Depletion von naiven TZ (hier  $CD4^+CD44^-$ ) in dieser Arbeit nicht reproduziert werden, sondern es konnte im Gegensatz dazu eine vergleichbare Depletion von naiven  $CD4^+$  TZ und CD4-Gedächtniszellen nachgewiesen werden (Abb. 13 und Abb. 14). Auf der anderen Seite konnte der postulierte Einfluss der Antigen-Dichte auf die Effektivität eines mAks in vivo (Alters et al., 1989; Isaacs et al., 1992; Niwa et al., 2005) in dieser Arbeit teilweise nachvollzogen werden. CD4 wird sowohl von TZ als auch von DZ exprimiert, wobei auf DZ wesentlich geringere mittlere Fluoreszenzintensitäten (MFI) als auf TZ gemessen wurden (nicht gezeigt). Damit korrelierend konnte im Gegensatz zu den TZ auch keine Depletion von DZ durch einmalige Gabe des mAk beobachtet werden (nicht gezeigt). Ob die fehlende Depletion allein auf die geringe Antigen-Dichte und damit den möglichen Einfluss auf die

Kreuzvernetzung und Modulation (weiter unten diskutiert) oder auf zellintrinsische Mechanismen zurückzuführen ist, kann dabei nicht näher beurteilt werden.

## **4.2 Die mAk-vermittelte CD4 TZD erfolgt hauptsächlich über FcγRs**

Wie eingangs beschrieben wurde, werden sowohl Komplement- oder FcγR-abhängige als auch apoptotische Prozesse als Mechanismen der CD4 TZD in der Literatur diskutiert (Kapitel 1.2). Diese wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht und werden nun im Einzelnen diskutiert

### **4.2.1 Komplementabhängige Reaktionen sind kein Hauptmechanismus der mAk-vermittelten CD4 TZD**

In dieser Arbeit wurde die Beteiligung des Komplementsystems an der CD4 TZD mit Hilfe von C3-defizienten Mäusen untersucht, da die Komplement-Komponente 3 (C3) eine zentrale Stellung in den verschiedenen Komplement-Reaktionen einnimmt (siehe Abb. 1). Die C3-Spaltprodukte sind sowohl an der Opsonierung von Pathogenen und körpereigenen Zellen zur effizienten Phagozytose, als auch an der Bildung des Membran-Angriffskomplexes und der Induzierung von Entzündungsreaktionen beteiligt (Rawal and Pangburn, 2003).

In dieser Arbeit konnte keine signifikante Beeinträchtigung der CD4 TZD in C3-defizienten Tieren beobachtet werden (Abb. 20), was zumindest C3 als hauptsächliches Effektormolekül der Depletion ausschließt. Frühere Studien (Uchida et al., 2004; Wofsy et al., 1985) stimmen mit dieser Schlussfolgerung überein. Das Komplementsystem kann aber auch in Abwesenheit von C3 aktiv sein, z.B. über C4a, das ebenfalls ein Opsonin ist. Darüber hinaus wird C5 nicht ausschließlich von den C5-Konvertasen des Komplementsystems gespalten, sondern auch Thrombin besitzt diese Aktivität (Amara et al., 2008; Huber-Lang et al., 2006). Aufgrund der Daten und der effizienten mAk-vermittelten Zelldepletion auch in C1q-, C4- bzw. C5-defizienten Tieren (Uchida et al., 2004; Wofsy et al., 1985), werden komplementabhängige Reaktionen als Hauptwirkmechanismus der CD4 TZD aber ausgeschlossen. Eine endgültige Aussage hinsichtlich



des Komplement-Einflusses auf die CD4 TZD würde wahrscheinlich erst die Verwendung von Tieren mit kombinierten Defizienzen für C3, C4 und C5 zulassen.

#### **4.2.2 Apoptose konnte als Effektormechanismus der CD4 TZD nicht nachgewiesen werden**

Wie in Kapitel 1.2 und 1.3.3 der Einleitung bereits kurz erwähnt wurde, existieren viele Studien im Zusammenhang mit Apoptose und mAk-vermittelter (CD4 TZ-) Depletion. In den meisten Fällen handelt es sich bei der untersuchten Apoptose jedoch um AICD, den Tod aktivierter reifer TZ außerhalb des Thymus (Algeciras et al., 1998; Choy et al., 1993; Newell et al., 1990). Janssen et al. (2000) fassen die zum Teil recht widersprüchlichen Befunde folgendermaßen zusammen. Im Zusammenhang mit der Aktivierung von CD4<sup>+</sup> TZ könne, abhängig vom untersuchten CD4<sup>+</sup> TZ-Subtyp, eine Bindung an CD4 (über mAk oder MHCII-Antigen-Komplexe) ko-aktivierend (auf ruhende TZ) oder inhibierend und apoptoseinduzierend (auf voraktivierte Zellen) wirken. In TZ ohne vorherige oder nachfolgende Aktivierung scheint die Ligation von CD4 jedoch direkt Apoptose auszulösen (Corbeil et al., 1996; Desbarats et al., 1996; Howie et al., 1994; Oyaizu et al., 1993; Tian et al., 1996; Wang et al., 1994).

##### **4.2.2.1 CD95 (Fas)-vermittelte Apoptose könnte an der CD4 TZD beteiligt sein**

Apoptotische Prozesse werden in vielen Fällen über die Fas-FasL-Interaktion vermittelt. Oyaizu et al. (1997) postulierten für Apoptose, die durch anti-CD4 mAk und Kreuzvernetzung ausgelöst wird, eine Abhängigkeit von der Interaktion zwischen CD95, dessen Expression auf kreuzvernetzten TZ induziert wird, mit seinem Partnermolekül CD95L (FasL). Gezeigt wurde dies mit humanen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC), wobei die Expression von FasL auf Monozyten (CD14<sup>+</sup>) die entscheidende Rolle bei der TZ-Apoptose spielte. Darüber hinaus konnte in Fas-defizienten Mäusen keine CD4 TZD induziert werden (Wang et al., 1994). Übereinstimmend mit Daten aus der Literatur (Desbarats et al., 1996) konnte in der vorliegenden Arbeit in vivo eine Erhöhung der Fas-Expression selektiv auf CD4<sup>+</sup> TZ innerhalb von 3-6 h nach mAk-Gabe detektiert werden (Abb. 36). Desbarats et al. (1996) beobachteten dies bereits 45 min nach anti-CD4 mAk-Gabe und Kreuzvernetzung und ebenfalls exklusiv auf CD4<sup>+</sup> TZ, wobei die Heraufregulation von Fas in dieser und der zitierten Arbeit dabei jeweils höchstens

zweifach war. Die Expression von Fas auf der Oberfläche allein reicht jedoch für eine Apoptose-Induktion nicht aus. Erst die Aktivität der Tyrosin-Kinase p56<sup>lck</sup>, die durch CD4-Kreuzvernetzung ausgelöst wird, führt zum Zelltod (Corbeil et al., 1996; Desbarats et al., 1996; Tian et al., 1996). Darüber hinaus wiesen Desbarats et al. (1996) darauf hin, dass nicht alle CD4<sup>+</sup> TZ nach der beschriebenen Behandlung starben, sondern wahrscheinlich nur ein nicht näher charakterisierter CD4-Subtyp. Eine Kreuzvernetzung des CD4-Moleküls ist in dem vorliegenden CD4 TZD-Modell durch FcγR gegeben und somit könnte die erhöhte Fas-Expression zur Apoptose zumindest einiger CD4<sup>+</sup> TZ beitragen.

Ungeachtet der hier diskutierten Hinweise auf eine Beteiligung von Fas an Apoptose und somit potenziell auch an der CD4 TZD, könnte Apoptose auch Fas-unabhängig, z.B. durch andere Zelltod-Rezeptoren (TNFR1, TRAILR1/2) oder auch zellintrinsisch induziert werden (Krammer et al., 2007).

#### **4.2.2.2 Aktivierte TZ werden ebenfalls depletiert**

Der in einigen Studien postulierte Schutz vor Apoptose durch Signale des CD3-TZR-Komplexes (mit anti-CD3ε mAk oder Superantigen) (Jamali et al., 1992; Wang et al., 1994) konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Weder im Vergleich von aktivierten (transferierten OT-II-Zellen) zu nicht-aktivierten (endogenen) Zellen, noch zwischen zeitlich unterschiedlich aktivierten Zellen (Abb. 18 und Abb. 19) konnte ein Unterschied in der CD4 TZD detektiert werden. Dies könnte zum einen damit erklärt werden, dass die in der TZ ausgelösten Signale wahrscheinlich dadurch modifiziert werden, ob sie durch anti-TZR mAk (oder Superantigen) oder durch Antigen-MHCII-Komplexe induziert werden. Außerdem wurden in dieser Arbeit durch LPS zusätzlich kostimulatorische Signale vermittelt, die bei Gabe von anti-TZR mAk oder Superantigen fehlen. Die TZ-Aktivierung durch Ova und LPS ist viel physiologischer, da nicht unspezifisch alle TZR-tragenden Zellen aktiviert werden, sondern nur eine kleine für das Antigen spezifische TZ-Population.

#### 4.2.2.3 Apoptose konnte in der CD4 TZD bisher nicht detektiert werden

Allerdings ist es in dieser Arbeit in mehreren verschiedenen Experimentansätzen nicht gelungen, eine Beteiligung von Apoptose an der CD4 TZD direkt nachzuweisen. Eine Methode zur Apoptose-Messung ist die Färbung mit AnnexinV, das an Phosphatidylserin (PS) bindet, welches im Verlauf des Zelltodes auf der äußeren Plasmaschicht exponiert wird (Raynal and Pollard, 1994). In vitro konnte in Kultur von Gesamtmilzzellen oder sortierten TZ mit verschiedenen Makrophagen-Populationen in Anwesenheit von anti-CD4 mAk keine verstärkte Apoptose der Zielzellen beobachtet werden (nicht gezeigt). Ob der fehlende Apoptosenachweis auf zu geringe Frequenzen oder aber Unterschiede in der Apoptose in vitro im Vergleich zu Apoptose in vivo zurückzuführen ist, ist unklar. In vivo konnte 6 h nach mAk-Gabe jedoch ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der AnnexinV-Färbung der verschiedenen Versuchsgruppen in der Milz festgestellt werden (nicht gezeigt). In diesem Fall ist es aber möglich, dass entweder die Apoptose gar nicht in der Milz abläuft (Wang et al., 1994) oder die apoptotischen Zellen zu schnell beseitigt werden (Howie et al., 1994). Wang et al. (1994) beschrieben eine Apoptosedetektion (über die Messung der DNA-Fragmentierung) 6–8 h nach mAk-Gabe nur im Blut, nicht aber in den Lk oder der Milz. Howie et al. (1994) konnten apoptotische Zellen in den Lk zwar licht- und elektronenmikroskopisch nachweisen, geben aber ein Zeitfenster von 4–8 h nach mAk-Gabe für die Detektion an, bevor die Zellen von Gewebemakrophagen beseitigt werden. Außerdem postulieren sie eine durchflusszytometrische Detektionsgrenze für eine Apoptoserate unter 8 %.

Ein weiterer Ansatz zur Analyse von Apoptose ist die Blockade von Caspasen, speziellen Proteasen, die an den meisten apoptotischen Prozessen beteiligt sind (Krammer et al., 2007). Ein in dieser Arbeit verwendeter Pan-Caspase-Inhibitor Q-VD-OPH hatte in vivo jedoch keinen Einfluss auf die CD4 TZD (Abb. 34). Dies könnte zum einen daran gelegen haben, dass andere Caspasen, die von dem Inhibitor nicht betroffen sind, aktiv waren (z.B. Caspasen 6, 7) (Caserta et al., 2003). Andererseits wird Apoptose nicht zwangsläufig durch Caspasen vermittelt, so dass möglicherweise ein Caspase-unabhängiger apoptotischer Prozess in die CD4 TZD involviert ist. Der Zeitpunkt der Inhibitor-Applikation von 2 h vor und 24 h nach mAk-Gabe wurde leicht modifiziert aus verschiedenen Protokollen diverser Studien gewählt (Braun et al., 2007; Brown et al.,

2007; Psotka et al., 2009) und scheint in das bereits erwähnte Zeitfenster der Apoptose-Detektion zu passen.

In weiterführenden Experimenten zur Klärung der Beteiligung von Apoptose an der CD4 TZD könnten von der Durchflusszytometrie unabhängige Techniken zur Apoptosemessung oder –inhibierung eingesetzt werden. Zum einen könnte die TUNEL-Färbung (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) angewandt werden, welche DNA-Brüche im Nukleus über den Einbau biotinylierter Deoxyuridine und den Einsatz von Avidin-Peroxidase im Lichtmikroskop detektierbar macht (Gavrieli et al., 1992). Darüber hinaus könnte Fas-abhängige Apoptose mit c-FLIPs (FLICE-inhibierende Proteine) blockiert bzw. der AICD durch Herbimycin A gehemmt werden (Janssen et al., 2000). FLICE ist eines der Proteine, die den Fas-DISC-Komplex bilden (siehe Kapitel 1.3.3); Herbimycin A inhibiert die Src-Kinase (Janssen et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit konnte also eine Beteiligung von Apoptose an der CD4 TZD weder eindeutig ausgeschlossen noch eindeutig bewiesen werden. Die ausschließlich auf den Zielzellen verstärkte Fas-Expression nach mAk-Gabe in vivo deutet jedoch eine Beteiligung von Apoptose an der CD4 TZD an.

### **4.2.3 FcγR sind die Haupteffektormoleküle der mAk-vermittelten CD4 TZD**

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass FcγR die wesentlichen an der mAk-vermittelten CD4 TZD beteiligten Moleküle sind. Dies wurde in früheren Studien bereits vermutet, konnte allerdings nur ansatzweise gezeigt werden (Hamaguchi et al., 2006; Jamali et al., 1992; Uchida et al., 2004; Wofsy et al., 1985). Im Folgenden wird erstmals die Beteiligung von FcγR an einzelnen Reaktionen der CD4 TZD diskutiert.

#### **4.2.3.1 Die CD4-Modulation kann über Kreuzvernetzung durch jeden FcγR ausgelöst werden**

Für viele Moleküle ist bereits eine Modulation in vivo beschrieben worden, wobei sowohl eine Internalisierung als auch ein Abschneiden des Moleküls an der Oberfläche (shedding) als Mechanismus möglich sind. Die Modulation von CD97 nach Bindung eines mAk erfolgt z.B. durch beide Prozesse (de Groot et al., 2009). Auch für

verschiedene Rezeptoren der Thrombozyten (z.B. GPVI, PECAM-1, Sema4D oder auch CD40L) wurde das Abschneiden der Rezeptoren durch Proteasen der ADAM-Familie beschrieben (Andrews et al., 2007). Auf BZ wird der Ligand von ICOS (ICOSL) nach Kontakt mit seinem Rezeptor ebenfalls schnell an der Zelloberfläche abgeschnitten (Logue et al., 2006).

Bezüglich der CD4-Modulation gibt es sowohl Hinweise auf Internalisierung und shedding (Reddy et al., 2000) als auch auf eine Abhängigkeit von Fc $\gamma$ -Rezeptoren (Fc $\gamma$ R) und eine Verbindung zur Depletion der Zellen. Gutstein et al. (1986) konnten nach Applikation von GK1.5-F(ab)<sup>2</sup>-Fragmenten (Antikörper-Moleküle ohne Fc-Teil) in vivo weder eine CD4-Modulation noch eine Depletion von CD4<sup>+</sup> TZ detektieren. Weiterführend dazu konnte in der vorliegenden Arbeit im Thymus weder eine CD4-Modulation noch eine Depletion der Thymozyten beobachtet werden (Abb. 12). Im Hinblick auf die Beteiligung von Fc $\gamma$ R an der CD4-Modulation und der Depletion konnten im Thymus im Gegensatz zur Milz auch nur sehr wenige Makrophagen (Fc $\gamma$ R-tragende Zellen) detektiert werden (Abb. 23). Darüber hinaus konnte hier gezeigt werden, dass die mAk-vermittelte CD4-Modulation, zumindest teilweise, auf eine Fc $\gamma$ R-abhängige Internalisierung des CD4-Moleküls zurückzuführen ist. In dem entsprechenden Experiment wurde die CD4<sup>+</sup> TZ-Oberfläche mit anti-CD4-Magnetpartikeln abgesättigt (keine Färbung von CD4 mehr möglich), und nur in Anwesenheit von Fc $\gamma$ R konnte über die Zeit CD4 wieder teilweise angefärbt werden, in Abwesenheit von Fc $\gamma$ R jedoch nicht (Abb. 10). Die wieder auftretende Färbung von CD4 könnte zwar auf ein Ablösen oder Abschneiden der Magnetpartikel zurückgeführt werden, hätte dann aber auch in der sortierten CD4<sup>+</sup> TZ-Suspension stattfinden müssen. Darüber hinaus konnten Magnetpartikel mittels Elektronenmikroskopie innerhalb der Zellen detektiert werden (Abb. 11).

Eine Beteiligung von Rezeptor-Shedding an der CD4-Oberflächen-Modulation wie bei CD97 kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, da beispielsweise Hepburn et al. (2003) während der Behandlung von RA-Patienten mit dem anti-CD4 mAk Clenoliximab von der Zelloberfläche gelöste CD4-mAk-Komplexe im Serum nachweisen konnten. Clenoliximab ist allerdings ein IgG4-mAk, der im Gegensatz zu seinem Vorläufer Keliximab nur eine sehr geringe Bindung an Fc $\gamma$ R aufweist. Mit Keliximab konnte jedoch in vitro ebenfalls die CD4-Modulation in PBMCs nicht aber auf sortierten CD4<sup>+</sup> TZ

nachgewiesen werden (Reddy et al., 2000). Diese Daten legen daher insgesamt den Schluss nahe, dass die CD4-Modulation durch Internalisierung nach Fc $\gamma$ R-abhängiger Kreuzvernetzung eines mAk ausgelöst wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte in diesem Zusammenhang erstmals gezeigt werden, dass die CD4-Modulation durch jeden beliebigen Fc $\gamma$ R ausgelöst werden kann. In FcR $\gamma$ -defizienten Tieren war nach mAk-Gabe die CD4-Modulation zwischen der Milz und den Lk vergleichbar (nicht gezeigt), in den Peyer-Plaques jedoch (wie auch in Wt-Tieren) etwas geringer. Dies kann damit erklärt werden, dass in FcR $\gamma$ -defizienten Tieren immer noch der Fc $\gamma$ RII exprimiert wird und die Kreuzvernetzung induzieren kann. Dieser Rezeptor hat jedoch eine schwächere Affinität zu allen IgG-Isotypen als die aktivierenden Rezeptoren (Nimmerjahn et al., 2005), weshalb die CD4-Modulation im Vergleich zu Wt-Tieren etwas verzögert war (nicht gezeigt). Dass nach der Blockade von Fc $\gamma$ RIV die CD4-Modulation nicht beeinträchtigt war (nicht gezeigt), ist ein weiterer Hinweis auf eine eher unspezifische Kreuzvernetzung des mAk durch Fc $\gamma$ R.

Ungeachtet der zugrunde liegenden Mechanismen könnte in einem weiterführenden Experiment zusätzlich getestet werden, ob auf Zellen mit CD4-Modulation der applizierte mAk auch noch nachweisbar ist. Dabei könnte zunächst mit einem Sekundärreagenz der mAk auf der Zelloberfläche und dann mit dem zweiten anti-CD4 mAk (GK1.5) CD4 auf derselben Zelle angefärbt werden. Durch dieses Experiment könnte getestet werden, ob die Voraussetzungen für die unter 4.3 diskutierte direkte Phagozytose durch Zielzell-Effektorzell-Interaktion über zellgebundenen mAk und Effektorzell-Fc $\gamma$ R in vivo überhaupt gegeben sind.

### **4.2.3.2 Die CD4 TZD ist indirekt an die CD4-Modulation gekoppelt**

In dieser Arbeit und in der Literatur gibt es ebenfalls Hinweise darauf, dass die CD4-Modulation zeitlich vor der CD4 TZD abläuft. Außerdem wäre es denkbar, dass die Modulation funktionell von der Depletion abgekoppelt ist und eher eine Zellwanderung auslöst.

Die zeitliche Trennung von Modulation und Depletion ist in Abb. 7 dargestellt. Die Zielzellen sind durch CFSE noch detektierbar, das CD4-Molekül jedoch nicht mehr. Die

Frage, ob CD4-Modulation und Zelldepletion direkt voneinander abhängen, bleibt weiter unklar. Gezeigt wurde durch den Einsatz von GK1.5-F(ab)<sup>2</sup>-Fragmenten, dass die CD4-Modulation von FcγR abhängig ist (Jamali et al., 1992). Unklar bleibt jedoch, ob auch die Depletion direkt durch FcγR vermittelt wird und auch ohne CD4-Modulation stattfinden könnte, oder ob die Depletion allein durch die vorherige Modulation ausgelöst wird.

Als Hinweis auf eine indirekte Verbindung von Modulation und Depletion können die Beobachtungen von Wang et al. (1994) genannt werden. Sie messen zu frühen Zeitpunkten nach mAk-Applikation eine Abnahme der Zielzellzahlen in den Lk und der Milz und eine zeitgleiche Zunahme der Zielzellzahlen im Blut. Nach ca. 24 h können im Blut wieder normale Zellzahlen gemessen werden, während die Zellzahlen in den Organen über die Zeit konstant abnehmen. Die Beobachtung der kontinuierlichen Zellzahlreduktion konnte in dieser Arbeit erstmals auch in Peyer-Plaques gezeigt werden (Abb. 9). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass die Depletion wahrscheinlich nicht direkt in den Lk und den Peyer-Plaques stattfindet. Wie schon mehrfach zitiert, werden Makrophagen als Effektorzellen der Depletion angesehen. In dieser Arbeit konnte mittels IHC gezeigt werden, dass in den Lk, im Thymus und in den Peyer-Plaques im Vergleich zur Milz und der Leber nur wenige Makrophagen (F4/80<sup>+</sup> Zellen) und auch wenige bzw. keine FcγRIV<sup>+</sup> Zellen zu finden sind (Abb. 23 und Abb. 24). FcγRIV wird im folgenden Kapitel als wesentlicher Mediator der CD4 TZD diskutiert. In den genannten Organen gibt es aber viele BZ, die den FcγRII exprimieren, welcher für eine CD4-Modulation und das Auslösen der Zellwanderung verantwortlich sein kann. Eine Depletion von Zellen über FcγRII wurde bisher nicht beschrieben. Abgesehen davon, dass die geringe Zahl möglicher Effektorzellen in den Lk und den Peyer-Plaques eine direkte Depletion der Zielzellen vor Ort unwahrscheinlich macht, würde die Depletion in diesen Organen dann aber entweder von FcγRI und FcγRIII zusammen abhängig sein, oder die beiden Rezeptoren können sich in ihrer Funktion gegenseitig ersetzen, denn die jeweils einzelne Defizienz für die beiden Rezeptoren hat keine Auswirkung auf die Reduktion der Zielzellen (Abb. 20). In FcRγ-defizienten Tieren war die Abnahme der Zielzellzahl (Abb. 20) in den beiden Organen im Vergleich zu Wt-Tieren aber nicht besonders stark reduziert, was auf eine Zellemigration und nicht Depletion hindeutet. Um die Auswanderung der Zellen zu überprüfen, könnte in weiteren Experimenten zum einen das Blut hinsichtlich der Zielzellzahl analysiert, zum anderen auch die Expression von



CD62L (L-Selectin) auf den TZ untersucht werden. Wird CD62L nicht moduliert, ist eine Emigration der Zellen nicht sehr wahrscheinlich.

#### **4.2.3.3 Die CD4 TZD findet in der Milz statt und wird von FcγRIV vermittelt**

In dieser Arbeit konnte erstmals eine Abhängigkeit der CD4 TZD in der Milz von FcγRIV gezeigt werden. In FcRγ-defizienten Tieren war nach mAk-Gabe die Depletion der Zielzellen in der Milz signifikant reduziert und konnte nicht auf das Fehlen von FcγRI, FcγRII, FcγRIII oder FcγRI/III zurückgeführt werden (Abb. 20). Nach Blockade von FcγRIV in vivo (Abb. 21 a) war die Depletion in der Milz und den Lk, nicht jedoch in den Peyer-Plaques, um die Hälfte reduziert. Diese Abhängigkeit der Depletion von FcγRIV korreliert mit der in dieser Arbeit erstmals gezeigten Expression des Rezeptors in den Organen (Abb. 23): stark in der Milz, schwach in den Lk und fehlend in den Peyer-Plaques. Die nicht vollständige inhibierte Depletion nach FcγRIV-Blockade könnte damit erklärt werden, dass die anderen aktivierenden FcγR einen gewissen Anteil an der Depletion in der Milz übernehmen. Der IgG2b-Isotyp des in dieser Arbeit verwendeten anti-CD4 mAk YTS191.1 kann von allen FcγR gebunden werden. FcγRIV weist aber eine höhere Affinität auf und bindet ausschließlich diesen Isotyp (Nimmerjahn et al., 2005). In dieser Hinsicht könnten die Expressionsverhältnisse der aktivierenden Rezeptoren untereinander durchaus die durch den in vivo applizierten mAk ausgelösten Reaktionen beeinflussen. Diese Expressionsverhältnisse sind nicht starr festgelegt, sondern werden beispielsweise durch Zytokine, LPS oder Komponenten des Komplementsystems reguliert (Nimmerjahn and Ravetch, 2008). Dementsprechend könnte die Expression von FcγRIV innerhalb einzelner Tiere oder auch Alters- und Geschlechtsgruppen durchaus variieren, was bisher allerdings nicht untersucht worden ist. Dies könnte zum einen die Streuung der Ergebnisse in den Versuchen mit FcγR erklären. Außerdem finden sich hier Hinweise auf eine mögliche Optimierung der mAk-basierten Immuntherapie. Durch die gezielt verstärkte Expression von FcγRIV in der Maus bzw. von FcγRIIIA im Menschen (Nimmerjahn et al., 2005) könnten FcγR-abhängige Reaktionen optimiert werden.

Die Depletion der Zellen in der Leber ist aufgrund des hohen Anteils an Makrophagen, die hohe Durchblutung des Organs und die starke Expression von FcγRIV ebenfalls möglich. Allerdings konnte die Depletion der Zielzellen sowohl in diesem Organ (nicht



gezeigt) als auch in der Milz nicht direkt nachgewiesen werden. Die Gründe dafür werden unter 4.2.3.5 diskutiert.

Es konnte also erstmals gezeigt werden, dass für die CD4 TZD zwei verschiedene Szenarien vorstellbar sind. Wenn nur in der Milz (und der Leber) eine Depletion stattfindet, ist diese von FcγRIV anhängig. Werden auch in den Lk und den Peyer-Plaques direkt die Zielzellen depletiert, ist dies von FcγRI und FcγRIII abhängig, wobei diese sich untereinander funktionell ersetzen können.

#### **4.2.3.4 Die potenziellen Effektorzellen der CD4 TZD in der Milz sind FcγRIV<sup>+</sup>, F4/80<sup>hoch</sup>, teilweise eisenhaltige Makrophagen der roten Pulpa**

Die vorliegende Arbeit gibt im Einklang mit den Arbeiten von Wofsy et al. (1985), Jamali et al. (1992) und Uchida et al. (2004) deutliche Hinweise auf Makrophagen als die potenziellen Effektorzellen der CD4 TZD. In dieser Arbeit wurde sowohl die Abhängigkeit der CD4 TZD von FcγRIV als auch die Expression des Rezeptors in den F4/80<sup>+</sup> Arealen der untersuchten Organe (Abb. 23, Abb. 24 und Abb. 25) zum ersten Mal nachgewiesen. Aufgrund dessen wurde in dieser Arbeit ebenfalls erstmalig eine umfassende Analyse von Subpopulationen primärer Zellen auf Proteinebene durchgeführt (Abb. 26). FcγRIV konnte dabei ausschließlich auf Phagozyten (DZ, Granulozyten und Makrophagen), nicht aber auf BZ, TZ, NKZ oder NK-TZ nachgewiesen werden, was auf eine Phagozytose der Zielzellen durch Interaktion des FcγRIV mit dem mAk auf den Zellen hindeutet. Innerhalb der Granulozyten und Makrophagen konnten nochmals unterschiedliche Expressionsniveaus auf den Subtypen detektiert werden. Die höchste Expression von FcγRIV ließ sich auf F4/80<sup>hoch</sup> Makrophagen nachweisen (Abb. 26 b), die darüber hinaus in der Durchflusszytometrie autofluoreszent erscheinen (Abb. 29) und endogenes Eisen enthalten (Abb. 30). Ein weiterer Hinweis auf die hohe FcγRIV-Expression dieser Zellen findet sich in der starken Anreicherung dieser Zellen nach der sowohl magnetisch basierten als auch durchflusszytometrischen Sortierung FcγRIV-exprimierender Milzzellen (Abb. 27 und Abb. 28).

Es ist darüber hinaus bekannt, dass die F4/80<sup>hoch</sup> Makrophagen der roten Pulpa in der Milz für die effiziente Phagozytose von Erythrozyten (ca. 2 % aller Erythrozyten pro Tag (Grimsley and Ravichandran, 2003)) verantwortlich sind (Kohyama et al., 2009; Taylor et

al., 2005) und somit zum Eisen-Kreislauf im Organismus beitragen (Hentze et al., 2004). Die Autofluoreszenz dieser Makrophagen korreliert mit der Einlagerung von Eisen als Ferritin, das von Apo-Proteinen umlagert und so zum weniger toxischen Ferrihydrit umgewandelt wird (Hentze et al., 2004).

Die Marginalzonenmakrophagen und die Metallophilen Makrophagen der Marginalzone werden aufgrund ihrer fehlenden Fc $\gamma$ RIV-Expression (Abb. 25 und Abb. 26) und im Einklang mit abweichenden biologischen Funktionen als direkte Effektorzellen der CD4 TZD ausgeschlossen. Für die Metallophilen Makrophagen ist nur eine geringe Phagozytose-Kapazität (Eikelenboom, 1978), die Prozessierung von Thymus-unabhängigen Antigenen, (besonders Endotoxinen) und eine Beteiligung an der Regulierung der Lymphozyten-Migration (über die Expression von Sialoadhäsine) in der Milz beschrieben (Kraal and Janse, 1986; van den Berg et al., 1992). Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass die Metallophilen Makrophagen nach Kontakt mit LPS in die BZ-Follikel einwandern und dort als so genannte Kerntrümmer-Makrophagen (Tingible Body Makrophages) apoptotische BZ aufnehmen (Kraal and Janse, 1986). Für die Marginalzonen-Makrophagen wurde eine Funktion in der Aufnahme neutraler Polysaccharide beschrieben (Kang et al., 2003; van Rooijen et al., 1989).

Um die Effektorfunktion der Fc $\gamma$ RIV<sup>+</sup>, teilweise eisenhaltigen F4/80<sup>hoch</sup> Makrophagen nachzuweisen, könnten diese durch die Applikation Clodronat- oder Dichlormethylen-bisphosphonat (DMBP)-haltiger Liposomen (Van Rooijen and Sanders, 1994) depletiert werden. Diese Technik ist zwar spezifisch gegen Makrophagen gerichtet, weil Liposomen von Natur aus phagozytiert und abgebaut werden und das enthaltene DMBP oder Clodronat erstens nicht entweichen kann und zweitens eine kurze Halbwertszeit in der Zirkulation hat (Van Rooijen and Sanders, 1994). Allerdings wirkt diese Technik nicht spezifisch auf einzelne Makrophagen-Subtypen. Die Depletion einzelner Makrophagen-Subtypen wäre bezüglich der Analyse ihrer Effektorfunktionen in der CD4 TZD daher vorteilhafter, ist bisher aber nicht beschrieben.

#### **4.2.3.5 Die Phagozytose der depletierten Zellen konnte in vivo bisher nicht nachgewiesen werden**

Sowohl in dieser Arbeit als auch in der Literatur konnte der Verbleib der depletierten Zellen in vivo nicht gezeigt werden. Sowohl in der Milz als auch der Leber (Daten nicht gezeigt) war es aus vielfältigen Gründen bisher nicht möglich, CFSE<sup>+</sup> bzw. magnetpartikelmarkierte Zellen nach der Gabe von YTS191.1 nachzuweisen.

Zum einen werden phagozytierte Zellen wahrscheinlich sehr schnell den Lysosomen zugeführt und darin mitsamt des CFSE abgebaut, sodass einerseits die Fluoreszenz des Farbstoffes als auch die Bindestellen des Nachweisreagenz der IHC zerstört werden. Außerdem kann CFSE aus Zellen, die z.B. durch Apoptose ihre Zellintegrität verlieren und „löchrig“ werden, schon vor der eventuellen Phagozytose entweichen und deshalb kein Signal innerhalb der potenziellen Effektorzellen der CD4 T<sub>H</sub>1 geben. Bei Verwendung von Magnetpartikeln als Markierungsprinzip stellt die Existenz endogenen Eisens in der Milz ein großes Problem bezüglich der Detektion der hier verwendeten Magnetpartikel dar. Durch Nachfrage bei der Herstellerfirma (Miltenyi) wurde in Erfahrung gebracht, dass die Magnetpartikel keinen kompakten Eisen-Kern besitzen. Vielmehr setzen sich die Magnetpartikel aus einem schwammähnlichen Dextran-Gerüst mit eingelagerten Eisen-Partikeln von ca. 3–5 nm Durchmesser zusammen. Innerhalb von Phagozyten werden die Dextranpartikel also ebenfalls abgebaut, so dass nur noch die kleineren Eisen-Partikel zurückbleiben, die von den endogenen Partikeln nicht zu unterscheiden sind. Dies erklärt, weshalb in der Elektronenmikroskopie nach Transfer magnetpartikelbeladener Zellen, Depletion und Sortierung von F4/80-exprimierenden Zellfraktionen der Milz keine Magnetpartikel innerhalb der Zellen nachgewiesen werden konnten (nicht gezeigt). Das Problem des Abbaus der Zellmarkierung könnte mit der Verwendung biologisch inerter Partikel verhindert werden. Zum einen bieten mehrere Firmen (Chemicell, Berlin; STEMCELL, Vancouver) verschiedene Partikel an, die tatsächlich aus einem Eisen-Kern bestehen, der größer als die endogenen Partikel ist. Darüber hinaus kann zur Zellmarkierung Gold verwendet werden, dass ebenso wie Eisen an Antikörper gekoppelt (Nanoprobes, Yaphank, NY; BritishBiocell, Cardiff, UK) und durch elektronenmikroskopische Elementaranalysen eindeutig von endogenem Eisen unterschieden werden kann. Die Verwendung von so genannten Quantum Dots macht die Detektion von markierten Zellen in der Durchflusszytometrie und der Konfokalen

Mikroskopie möglich, weil diese aus Nanokristallen bestehenden Partikel bei Anregung mit Lichtenergie fluoreszieren (Jaiswal and Simon, 2007; Smith and Nie, 2009). Die Verwendung des pH-sensitiven Farbstoffes pHrodo Succinimidyl Ester für die Markierung der Zielzellen könnte ebenfalls bei der Verfolgung der depletierten Zellen helfen. Dieser Farbstoff wird erst bei saurem pH, wie er in den Lysozymen von Makrophagen vorhanden ist, fluoreszent und so könnten für diesen Farbstoff positive Zellen in der Durchflusszytometrie detektiert werden (Miksa et al., 2009).

Eine weitere Schwierigkeit der Visualisierung des Verbleibs der depletierten Zellen in dem vorliegenden System ist die geringe Frequenz der markierten Zellen im Vergleich zu den unmarkierten, endogenen Zielzellen. Wie bereits beschrieben und in Abb. 33 dargestellt, repräsentierten die transferierten Zellen maximal 1–2 % der Milzzellen, während die Frequenz der endogenen CD4<sup>+</sup> TZ 15–20 % betrug. Die Detektion der markierten Zellen innerhalb der 4–5 % FcγRIV<sup>+</sup> Zellen der Milz in Konkurrenz zu den unmarkierten Zellen wäre auch ohne die Probleme der instabilen Zellmarkierung schwierig. Eine mögliche Lösung für das Problem der geringen Frequenz markierter Zielzellen wäre die Verwendung von TZ-defizienten Mäusen ( $\alpha,\beta$ -TZR<sup>-/-</sup>) oder RAG<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne BZ und TZ. Ein Pilotexperiment mit  $\alpha,\beta$ -TZR-defizienten Tieren blieb aufgrund der bereits beschriebenen Instabilität der Zellmarkierung jedoch bezüglich der Visualisierung der depletierten Zellen ohne Erfolg (Daten nicht gezeigt).

Ausgehend von der Korrelation der hohen FcγRIV- und F4/80-Expression könnten diese Zellen in weiterführenden Experimenten auf ihre potenzielle Effektorfunktion in der CD4 TZD getestet werden. Sortierte, entsprechend markierte CD4<sup>+</sup> TZ könnten mit den verschiedenen Milzzellfraktionen der durchflusszytometrischen Sortierung (F4/80-Expression, Abb. 29) mit oder ohne YTS191.1 in vitro kultiviert werden. Dabei könnten sowohl das Verhältnis von Ziel- zu Effektorzellen als auch die Analysezeitpunkte sowie der Analyse-Assay variiert werden; Gesamtmilzzellen wären die Kontrolle. Analysiert werden könnte sowohl die Zielzellzahl als auch die Expression von Fas bzw. FasL oder die Färbung mit AnnexinV. Außerdem könnte der Verbleib der Zellen über ihre Markierung verfolgt werden. Dem entsprechend könnten in vivo die verschiedenen FcγRIV-kompetenten Milzzellfraktionen aus Wt-Tieren (Abb. 29) in FcRγ-defiziente Tiere transferiert werden. Da in den Rezipiententieren keine wesentliche Depletion stattfindet, könnte so festgestellt werden, ob und welche sortierte Zellfraktion die

Depletion vermittelt. Durch den Kotransfer der oben genannten Milzzellfraktionen mit markierten sortierten CD4<sup>+</sup> TZ wäre die Detektion der markierten Zellen innerhalb der transferierten potenziellen Effektorzellen der CD4 TZD möglich. Um das bereits beschriebene Problem der geringen Zielzellfrequenz zu vermeiden könnten entweder FcRγ- α,β-TZR-defiziente Rezipiententiere verwendet werden oder die markierten Zielzellen durch die Beladung mit dem mAk in vitro selektiv depletiert und verfolgt werden.

### 4.3 Potenzieller Mechanismus der mAk-vermittelten CD4 TZD

Anhand der oben diskutierten eigenen Daten und publizierten Hinweise ist für die YTS191.1-vermittelte CD4 TZD folgender Ablauf denkbar:

1. Unmittelbar nach der Applikation in vivo bindet der anti-CD4 mAk mit dem Isotyp IgG2b an die Zielzellen, was zur Kreuzvernetzung durch jeden beliebigen FcγR und daraus resultierend die Modulation (über teilweise Internalisierung) von CD4 führt.
2. Die CD4-Modulation löst die Wanderung der mAk<sup>+</sup> Zellen aus den Organen in das Blut und in die depletierenden Organe Milz und Leber aus. Die Depletion der Zielzellen in allen untersuchten Organen selbst ist ebenfalls möglich, wenn auch unwahrscheinlich. Es ist auch möglich, dass bereits im Blut Apoptose über die Induktion von Fas auf den Ziel- und FasL auf den Effektorzellen (Monozyten) ausgelöst wird.
3. In Milz und Leber werden die Zellen dann entweder durch direkte oder durch indirekte Phagozytose aus dem Organismus entfernt. Die direkte Phagozytose wird durch die Bindung des mAk auf der Zelle (entweder durch unvollständige Internalisierung auf der Zelle verblieben oder durch Rezirkulation des CD4-Moleküls erneut gebunden) an den FcγR der Effektorzellen der Depletion ausgelöst. In diesem Fall sind die potenziellen Effektorzellen FcγRIV<sup>+</sup> F4/80<sup>hoch</sup> Makrophagen. Komplementvermittelte Reaktionen können zur direkten Phagozytose der mAk<sup>+</sup> Zielzellen beitragen. Eine indirekte Phagozytose kann durch die Ausschüttung z.B. zytotoxische Moleküle wie Granzyme nach der Interaktion des mAk mit den FcγR ausgelöst werden. Alternativ dazu kann durch

die Interaktion zwischen Effektor- und Zielzelle auch erst zu diesem Zeitpunkt Apoptose induziert werden. Die sterbenden Zellen können dann entweder direkt durch die todauslösende oder durch benachbarte Zellen phagozytiert werden. Diese benachbarten Effektorzellen könnten darüber hinaus Fc $\gamma$ RIV-unabhängig einzig auf die Todessignale, die durch apoptotische Zellen exprimiert werden (z.B. PS, AnnexinI, modifiziertes ICAM-3 oder CD31)(Grimsley and Ravichandran, 2003), reagieren.

Es wird hier deutlich, dass die mAk-vermittelte CD4 TZD wahrscheinlich über ein komplexes Netzwerk einzelner Prozesse erfolgt. Die endgültige Klärung, inwieweit die hier postulierten Prozesse der CD4 TZD zutreffen, bietet Raum für weiterführende Experimente.

#### **4.4 Die Depletion von ICOS<sup>+</sup> Zellen unterscheidet sich von der CD4 TZD**

Da nicht bekannt ist, ob die mAk-vermittelte Depletion jeglicher Zielzellen möglich ist und durch dieselben Effektormoleküle bzw. -zellen wie die CD4 TZD erfolgt, wurde in dieser Arbeit ein erstes Experiment zur Depletion von ICOS<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zur Depletion von CD4<sup>+</sup> TZ durchgeführt (Abb. 38). Basierend auf demselben Modell (d.h. äquivalente mAk-Menge, Depletionsdauer und Applikationsroute) konnte zwar mit anti-CD4 mAk eine Reduktion der Zielzellen um 90 % beobachtet werden, die Reduktion durch anti-ICOS mAk hingegen betrug maximal 50 %. Allerdings kann in diesem Zusammenhang nur von einer Reduktion der Zellzahl und nicht von einer Depletion gesprochen werden, weil in diesem System nicht klar ist, ob die Zellen wirklich aus dem Organismus entfernt werden. Da ICOS im Gegensatz zu CD4 erst nach Aktivierung der Zellen exprimiert wird, und die Zellen durch die Aktivierung proliferieren, können die geringeren Zellzahlen in den anti-ICOS mAk-behandelten Tieren auch auf einer reduzierten Zellproliferation basieren. Dies könnte durch CFSE-Markierung der Zellen in einem Proliferations-Assay, der auf der Abnahme der MFI von CFSE durch Zellteilung beruht, überprüft werden. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass zum Zeitpunkt der mAk-Gabe ICOS zu vollem Umfang exprimiert war und daher mit seinem natürlichen Liganden interagieren konnte. Dies könnte zum einen ein Signal in die ICOS<sup>+</sup> Zelle übermitteln, das die Proliferation verstärkt (Burmeister et al., 2008) oder auch Apoptose

verhindert. Zum anderen könnte die ICOS-ICOSL-Interaktion die Bindung der mAk blockieren und damit auch eine Phagozytose der Zellen über FcγR verhindern. Die unveränderte Zellzahl nach mAk 369-Gabe im Vergleich zur Kontrolle deutet z.B. darauf hin, dass der mAk, möglicherweise durch die Bindung von ICOSL, nicht an die Zielzellen gebunden hat. ICOS könnte auch durch Internalisierung oder Abschneiden des Moleküls moduliert werden, was bisher nicht beschrieben wurde. Ebenfalls denkbar wäre, dass die reduzierte Zellzahl durch ein Zusammenwirken von Depletion und die Proliferation noch nicht mAk-beladener Zellen herbeigeführt wird. Auffällig ist auch, dass verschiedene mAk des gleichen Isotyps unterschiedliche Effekte in Bezug auf die Reduktion der Zielzellen bewirken. Dies impliziert, dass die Unterschiede in der Zielzelldepletion durch anti-CD4 mAk und anti-ICOS mAk hauptsächlich auf den verschiedenen Eigenschaften der Zielmoleküle (Kostimulator bzw. Korezeptor, Interaktion mit Ligand) und der mAk (Konkurrenz zu ICOSL) beruht und nicht darauf, ob und welche FcγR beteiligt sind.

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass sich die CD4 T<sub>H</sub>2 von der Depletion ICOS<sup>+</sup> Zellen in dem verwendeten Modell unterscheidet, wobei die Gründe dafür nicht geklärt sind.



## Literaturverzeichnis

- Aicher, A., Hayden-Ledbetter, M., Brady, W.A., Pezzutto, A., Richter, G., Magaletti, D., Buckwalter, S., Ledbetter, J.A., and Clark, E.A. (2000). Characterization of human inducible costimulator ligand expression and function. *J Immunol* 164, 4689-4696.
- Akiyama, K., Karaki, M., Kobayshi, R., Dobashi, H., Ishida, T., and Mori, N. (2009). IL-16 variability and modulation by antiallergic drugs in a murine experimental allergic rhinitis model. *Int Arch Allergy Immunol* 149, 315-322.
- Algeciras, A., Dockrell, D.H., Lynch, D.H., and Paya, C.V. (1998). CD4 regulates susceptibility to Fas ligand- and tumor necrosis factor-mediated apoptosis. *J Exp Med* 187, 711-720.
- Alters, S.E., Steinman, L., and Oi, V.T. (1989). Comparison of rat and rat-mouse chimeric anti-murine CD4 antibodies in vitro. Chimeric antibodies lyse low-density CD4+ cells. *J Immunol* 142, 2018-2023.
- Amara, U., Rittirsch, D., Flierl, M., Bruckner, U., Klos, A., Gebhard, F., Lambris, J.D., and Huber-Lang, M. (2008). Interaction between the coagulation and complement system. *Adv Exp Med Biol* 632, 71-79.
- Andrews, R.K., Karunakaran, D., Gardiner, E.E., and Berndt, M.C. (2007). Platelet receptor proteolysis: a mechanism for downregulating platelet reactivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 1511-1520.
- Austyn, J.M., and Gordon, S. (1981). F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol* 11, 805-815.
- Barnden, M.J., Allison, J., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (1998). Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol Cell Biol* 76, 34-40.
- Beier, K.C., Hutloff, A., Lohning, M., Kallinich, T., Kroczeck, R.A., and Hamelmann, E. (2004). Inducible costimulator-positive T cells are required for allergen-induced local B-cell infiltration and antigen-specific IgE production in lung tissue. *J Allergy Clin Immunol* 114, 775-782.
- Bellinghausen, I., Klostermann, B., Bottcher, I., Knop, J., and Saloga, J. (2004). Importance of the inducible costimulator molecule for the induction of allergic immune responses and its decreased expression on T helper cells after venom immunotherapy. *Immunology* 112, 80-86.
- Braun, J.S., Prass, K., Dirnagl, U., Meisel, A., and Meisel, C. (2007). Protection from brain damage and bacterial infection in murine stroke by the novel caspase-inhibitor Q-VD-OPH. *Exp Neurol* 206, 183-191.

- Brinkley, M. (1992). A brief survey of methods for preparing protein conjugates with dyes, haptens, and cross-linking reagents. *Bioconjug Chem* 3, 2-13.
- Broome, H.E., Dargan, C.M., Krajewski, S., and Reed, J.C. (1995). Expression of Bcl-2, Bcl-x, and Bax after T cell activation and IL-2 withdrawal. *J Immunol* 155, 2311-2317.
- Brown, N.M., Martin, S.M., Maurice, N., Kuwana, T., and Knudson, C.M. (2007). Caspase inhibition blocks cell death and results in cell cycle arrest in cytokine-deprived hematopoietic cells. *J Biol Chem* 282, 2144-2155.
- Burmeister, Y., Lischke, T., Dahler, A.C., Mages, H.W., Lam, K.P., Coyle, A.J., Kroczeck, R.A., and Hutloff, A. (2008). ICOS controls the pool size of effector-memory and regulatory T cells. *J Immunol* 180, 774-782.
- Carroll, M.C., and Fischer, M.B. (1997). Complement and the immune response. *Curr Opin Immunol* 9, 64-69.
- Caserta, T.M., Smith, A.N., Gultice, A.D., Reedy, M.A., and Brown, T.L. (2003). Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties. *Apoptosis* 8, 345-352.
- Chen, X.L., Cao, X.D., Kang, A.J., Wang, K.M., Su, B.S., and Wang, Y.L. (2003). In situ expression and significance of B7 costimulatory molecules within tissues of human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 9, 1370-1373.
- Chialda, L., Zhang, M., Brune, K., and Pahl, A. (2005). Inhibitors of mitogen-activated protein kinases differentially regulate costimulated T cell cytokine production and mouse airway eosinophilia. *Respir Res* 6, 36.
- Chipuk, J.E., Fisher, J.C., Dillon, C.P., Kriwacki, R.W., Kuwana, T., and Green, D.R. (2008). Mechanism of apoptosis induction by inhibition of the anti-apoptotic BCL-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 20327-20332.
- Choi, B.M., Pae, H.O., Jang, S.I., Kim, Y.M., and Chung, H.T. (2002). Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. *J Biochem Mol Biol* 35, 116-126.
- Choy, E.H., Adjaye, J., Forrest, L., Kingsley, G.H., and Panayi, G.S. (1993). Chimaeric anti-CD4 monoclonal antibody cross-linked by monocyte Fc gamma receptor mediates apoptosis of human CD4 lymphocytes. *Eur J Immunol* 23, 2676-2681.
- Choy, E.H., Kingsley, G.H., and Panayi, G.S. (1998). Anti-CD4 monoclonal antibodies in rheumatoid arthritis. *Springer Semin Immunopathol* 20, 261-273.
- Cobbold, S.P., Jayasuriya, A., Nash, A., Prospero, T.D., and Waldmann, H. (1984). Therapy with monoclonal antibodies by elimination of T-cell subsets in vivo. *Nature* 312, 548-551.

- Coffman, R.L. (1982). Surface antigen expression and immunoglobulin gene rearrangement during mouse pre-B cell development. *Immunol Rev* 69, 5-23.
- Cole, J.A., McCarthy, S.A., Rees, M.A., Sharrow, S.O., and Singer, A. (1989). Cell surface comodulation of CD4 and T cell receptor by anti-CD4 monoclonal antibody. *J Immunol* 143, 397-402.
- Corbeil, J., Tremblay, M., and Richman, D.D. (1996). HIV-induced apoptosis requires the CD4 receptor cytoplasmic tail and is accelerated by interaction of CD4 with p56lck. *J Exp Med* 183, 39-48.
- de Groot, D.M., Vogel, G., Dulos, J., Teeuwen, L., Stebbins, K., Hamann, J., Owens, B.M., van Eenennaam, H., Bos, E., and Boots, A.M. (2009). Therapeutic antibody targeting of CD97 in experimental arthritis: the role of antigen expression, shedding, and internalization on the pharmacokinetics of anti-CD97 monoclonal antibody 1B2. *J Immunol* 183, 4127-4134.
- Desbarats, J., Freed, J.H., Campbell, P.A., and Newell, M.K. (1996). Fas (CD95) expression and death-mediating function are induced by CD4 cross-linking on CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11014-11018.
- Dhodapkar, M.V., Dhodapkar, K.M., and Li, Z. (2008). Role of chaperones and FcγR in immunogenic death. *Curr Opin Immunol* 20, 512-517.
- Ding, H., Wu, X., Wu, J., Yagita, H., He, Y., Zhang, J., Ren, J., and Gao, W. (2006). Delivering PD-1 inhibitory signal concomitant with blocking ICOS co-stimulation suppresses lupus-like syndrome in autoimmune BXSB mice. *Clin Immunol* 118, 258-267.
- Eikelenboom, P. (1978). Characterization of non-lymphoid cells in the white pulp of the mouse spleen: an in vivo and in vitro study. *Cell Tissue Res* 195, 445-460.
- Eisen, S.A., Wedner, H.J., and Parker, C.W. (1972). Isolation of pure human peripheral blood T-lymphocytes using nylon wool columns. *Immunol Commun* 1, 571-577.
- Elyaman, W., Kivisakk, P., Reddy, J., Chitnis, T., Raddassi, K., Imitola, J., Bradshaw, E., Kuchroo, V.K., Yagita, H., Sayegh, M.H., *et al.* (2008). Distinct functions of autoreactive memory and effector CD4+ T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol* 173, 411-422.
- Fischer, M.B., Ma, M., Goerg, S., Zhou, X., Xia, J., Finco, O., Han, S., Kelsoe, G., Howard, R.G., Rothstein, T.L., *et al.* (1996). Regulation of the B cell response to T-dependent antigens by classical pathway complement. *J Immunol* 157, 549-556.
- Fridman, W.H. (1991). Fc receptors and immunoglobulin binding factors. *Faseb J* 5, 2684-2690.

- Gavett, S.H., Chen, X., Finkelman, F., and Wills-Karp, M. (1994). Depletion of murine CD4+ T lymphocytes prevents antigen-induced airway hyperreactivity and pulmonary eosinophilia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10, 587-593.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., and Ben-Sasson, S.A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119, 493-501.
- Goding, J.W., ed. (1996). *Monoclonal Antibodies: Principle and practice* third edition edn (Academic Press).
- Gonzalo, J.A., Tian, J., Delaney, T., Corcoran, J., Rottman, J.B., Lora, J., Al-garawi, A., Kroczeck, R., Gutierrez-Ramos, J.C., and Coyle, A.J. (2001). ICOS is critical for T helper cell-mediated lung mucosal inflammatory responses. *Nat Immunol* 2, 597-604.
- Green, D.R., Ferguson, T., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2009). Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat Rev Immunol* 9, 353-363.
- Grimbacher, B., Hutloff, A., Schlesier, M., Glocker, E., Warnatz, K., Drager, R., Eibel, H., Fischer, B., Schaffer, A.A., Mages, H.W., *et al.* (2003). Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol* 4, 261-268.
- Grimsley, C., and Ravichandran, K.S. (2003). Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat-me and come-get-me signals. *Trends Cell Biol* 13, 648-656.
- Guillonneau, C., Aubry, V., Renaudin, K., Seveno, C., Usal, C., Tezuka, K., and Anegon, I. (2005). Inhibition of chronic rejection and development of tolerogenic T cells after ICOS-ICOSL and CD40-CD40L co-stimulation blockade. *Transplantation* 80, 546-554.
- Guo, L., Li, X.K., Enosawa, S., Funeshima, N., Suzuki, S., Kimura, H., Sugawara, Y., Tezuka, K., and Makuuchi, M. (2004). Significant enhancement by anti-ICOS antibody of suboptimal tacrolimus immunosuppression in rat liver transplantation. *Liver Transpl* 10, 743-747.
- Hallgren, B., and Sourander, P. (1958). The effect of age on the non-haemin iron in the human brain. *J Neurochem* 3, 41-51.
- Hamaguchi, Y., Xiu, Y., Komura, K., Nimmerjahn, F., and Tedder, T.F. (2006). Antibody isotype-specific engagement of Fcγ receptors regulates B lymphocyte depletion during CD20 immunotherapy. *J Exp Med* 203, 743-753.
- Hara, Y., Kitazawa, Y., Funeshima, N., Kawasaki, M., Sato, Y., Tezuka, K., Kimura, H., Hatakeyama, K., and Li, X.K. (2006). Anergic lymphocytes generated by blocking CD28 and ICOS pathways in vitro prolong rat cardiac graft survival. *Int Immunopharmacol* 6, 1143-1151.

- Hazenbos, W.L., Gessner, J.E., Hofhuis, F.M., Kuipers, H., Meyer, D., Heijnen, I.A., Schmidt, R.E., Sandor, M., Capel, P.J., Daeron, M., *et al.* (1996). Impaired IgG-dependent anaphylaxis and Arthus reaction in Fc gamma RIII (CD16) deficient mice. *Immunity* 5, 181-188.
- Hemmi, H., Idoyaga, J., Suda, K., Suda, N., Kennedy, K., Noda, M., Aderem, A., and Steinman, R.M. (2009). A new triggering receptor expressed on myeloid cells (Trem) family member, Trem-like 4, binds to dead cells and is a DNAX activation protein 12-linked marker for subsets of mouse macrophages and dendritic cells. *J Immunol* 182, 1278-1286.
- Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U., and Andrews, N.C. (2004). Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 117, 285-297.
- Hepburn, T.W., Totoritis, M.C., and Davis, C.B. (2003). Antibody-mediated stripping of CD4 from lymphocyte cell surface in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 42, 54-61.
- Hestdal, K., Ruscetti, F.W., Ihle, J.N., Jacobsen, S.E., Dubois, C.M., Kopp, W.C., Longo, D.L., and Keller, J.R. (1991). Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *J Immunol* 147, 22-28.
- Howie, S.E., Sommerfield, A.J., Gray, E., and Harrison, D.J. (1994). Peripheral T lymphocyte depletion by apoptosis after CD4 ligation in vivo: selective loss of CD44- and 'activating' memory T cells. *Clin Exp Immunol* 95, 195-200.
- Huang, L., Soldevila, G., Leeker, M., Flavell, R., and Crispe, I.N. (1994). The liver eliminates T cells undergoing antigen-triggered apoptosis in vivo. *Immunity* 1, 741-749.
- Hubbard, V.M., Eng, J.M., Ramirez-Montagut, T., Tjoe, K.H., Muriglan, S.J., Kochman, A.A., Terwey, T.H., Willis, L.M., Schiro, R., Heller, G., *et al.* (2005). Absence of inducible costimulator on alloreactive T cells reduces graft versus host disease and induces Th2 deviation. *Blood* 106, 3285-3292.
- Huber-Lang, M., Sarma, J.V., Zetoune, F.S., Rittirsch, D., Neff, T.A., McGuire, S.R., Lambris, J.D., Warner, R.L., Flierl, M.A., Hoesel, L.M., *et al.* (2006). Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med* 12, 682-687.
- Hutloff, A., Buchner, K., Reiter, K., Baelde, H.J., Odendahl, M., Jacobi, A., Dorner, T., and Krocze, R.A. (2004). Involvement of inducible costimulator in the exaggerated memory B cell and plasma cell generation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 50, 3211-3220.
- Hutloff, A., Dittrich, A.M., Beier, K.C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., and Krocze, R.A. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397, 263-266.

- Ioan-Facsinay, A., de Kimpe, S.J., Hellwig, S.M., van Lent, P.L., Hofhuis, F.M., van Ojik, H.H., Sedlik, C., da Silveira, S.A., Gerber, J., de Jong, Y.F., *et al.* (2002). FcγRI (CD64) contributes substantially to severity of arthritis, hypersensitivity responses, and protection from bacterial infection. *Immunity* 16, 391-402.
- Isaacs, J.D., Clark, M.R., Greenwood, J., and Waldmann, H. (1992). Therapy with monoclonal antibodies. An in vivo model for the assessment of therapeutic potential. *J Immunol* 148, 3062-3071.
- Jacobson, J.M., Kuritzkes, D.R., Godofsky, E., DeJesus, E., Larson, J.A., Weinheimer, S.P., and Lewis, S.T. (2009). Safety, pharmacokinetics, and antiretroviral activity of multiple doses of ibalizumab (formerly TNX-355), an anti-CD4 monoclonal antibody, in human immunodeficiency virus type 1-infected adults. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 450-457.
- Jaiswal, J.K., and Simon, S.M. (2007). Optical monitoring of single cells using quantum dots. *Methods Mol Biol* 374, 93-104.
- Jamali, I., Field, E.H., Fleming, A., and Cowdery, J.S. (1992). Kinetics of anti-CD4-induced T helper cell depletion and inhibition of function. Activation of T cells by the CD3 pathway inhibits anti-CD4-mediated T cell elimination and down-regulation of cell surface CD4. *J Immunol* 148, 1613-1619.
- Janssen, O., Sanzenbacher, R., and Kabelitz, D. (2000). Regulation of activation-induced cell death of mature T-lymphocyte populations. *Cell Tissue Res* 301, 85-99.
- Jost, P.J., Grabow, S., Gray, D., McKenzie, M.D., Nachbur, U., Huang, D.C., Bouillet, P., Thomas, H.E., Borner, C., Silke, J., *et al.* (2009). XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature* 460, 1035-1039.
- Kang, Y.S., Yamazaki, S., Iyoda, T., Pack, M., Bruening, S.A., Kim, J.Y., Takahara, K., Inaba, K., Steinman, R.M., and Park, C.G. (2003). SIGN-R1, a novel C-type lectin expressed by marginal zone macrophages in spleen, mediates uptake of the polysaccharide dextran. *Int Immunol* 15, 177-186.
- Kashizuka, H., Sho, M., Nomi, T., Ikeda, N., Kuzumoto, Y., Akashi, S., Tsurui, Y., Mizuno, T., Kanehiro, H., Yagita, H., *et al.* (2005). Role of the ICOS-B7h costimulatory pathway in the pathophysiology of chronic allograft rejection. *Transplantation* 79, 1045-1050.
- Kim, J., Kim, H.J., Park, K., Choi, H.J., Yagita, H., Nam, S.H., Cho, H.R., and Kwon, B. (2007). Costimulatory molecule-targeted immunotherapy of cutaneous graft-versus-host disease. *Blood* 110, 776-782.
- Kohyama, M., Ise, W., Edelson, B.T., Wilker, P.R., Hildner, K., Mejia, C., Frazier, W.A., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2009). Role for Spi-C in the development of red pulp macrophages and splenic iron homeostasis. *Nature* 457, 318-321.



- Kraal, G., and Janse, M. (1986). Marginal metallophilic cells of the mouse spleen identified by a monoclonal antibody. *Immunology* 58, 665-669.
- Krammer, P.H., Arnold, R., and Lavrik, I.N. (2007). Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol* 7, 532-542.
- Kroczeck, R., and Hamelmann, E. (2005). T-cell costimulatory molecules: optimal targets for the treatment of allergic airway disease with monoclonal antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 116, 906-909.
- Kroczeck, R.A., Mages, H.W., and Hutloff, A. (2004). Emerging paradigms of T-cell co-stimulation. *Curr Opin Immunol* 16, 321-327.
- Lafferty, K.J., and Cunningham, A.J. (1975). A new analysis of allogeneic interactions. *Aust J Exp Biol Med Sci* 53, 27-42.
- Logue, E.C., Bakkour, S., Murphy, M.M., Nolla, H., and Sha, W.C. (2006). ICOS-induced B7h shedding on B cells is inhibited by TLR7/8 and TLR9. *J Immunol* 177, 2356-2364.
- Miksa, M., Komura, H., Wu, R., Shah, K.G., and Wang, P. (2009). A novel method to determine the engulfment of apoptotic cells by macrophages using pHrodo succinimidyl ester. *J Immunol Methods* 342, 71-77.
- Miltenyi, S., Muller, W., Weichel, W., and Radbruch, A. (1990). High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11, 231-238.
- Newell, M.K., Haughn, L.J., Maroun, C.R., and Julius, M.H. (1990). Death of mature T cells by separate ligation of CD4 and the T-cell receptor for antigen. *Nature* 347, 286-289.
- Nimmerjahn, F., Bruhns, P., Horiuchi, K., and Ravetch, J.V. (2005). FcγRIIV: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity* 23, 41-51.
- Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2006). Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity* 24, 19-28.
- Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 8, 34-47.
- Niwa, R., Sakurada, M., Kobayashi, Y., Uehara, A., Matsushima, K., Ueda, R., Nakamura, K., and Shitara, K. (2005). Enhanced natural killer cell binding and activation by low-fucose IgG1 antibody results in potent antibody-dependent cellular cytotoxicity induction at lower antigen density. *Clin Cancer Res* 11, 2327-2336.
- Oi, V.T., Glazer, A.N., and Stryer, L. (1982). Fluorescent phycobiliprotein conjugates for analyses of cells and molecules. *J Cell Biol* 93, 981-986.



- Okamoto, T., Saito, S., Yamanaka, H., Tomatsu, T., Kamatani, N., Ogiuchi, H., Uchiyama, T., and Yagi, J. (2003). Expression and function of the co-stimulator H4/ICOS on activated T cells of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 30, 1157-1163.
- Ortega, G., Robb, R.J., Shevach, E.M., and Malek, T.R. (1984). The murine IL 2 receptor. I. Monoclonal antibodies that define distinct functional epitopes on activated T cells and react with activated B cells. *J Immunol* 133, 1970-1975.
- Owens, T., Fazekas de St Groth, B., and Miller, J.F. (1987). Coaggregation of the T-cell receptor with CD4 and other T-cell surface molecules enhances T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 9209-9213.
- Oyaizu, N., Adachi, Y., Hashimoto, F., McCloskey, T.W., Hosaka, N., Kayagaki, N., Yagita, H., and Pahwa, S. (1997). Monocytes express Fas ligand upon CD4 cross-linking and induce CD4+ T cells apoptosis: a possible mechanism of bystander cell death in HIV infection. *J Immunol* 158, 2456-2463.
- Oyaizu, N., McCloskey, T.W., Coronesi, M., Chirmule, N., Kalyanaraman, V.S., and Pahwa, S. (1993). Accelerated apoptosis in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from human immunodeficiency virus type-1 infected patients and in CD4 cross-linked PBMCs from normal individuals. *Blood* 82, 3392-3400.
- Pekna, M., Hietala, M.A., Rosklint, T., Betsholtz, C., and Pekny, M. (1998). Targeted disruption of the murine gene coding for the third complement component (C3). *Scand J Immunol* 47, 25-29.
- Podojil, J.R., and Miller, S.D. (2009). Molecular mechanisms of T-cell receptor and costimulatory molecule ligation/blockade in autoimmune disease therapy. *Immunol Rev* 229, 337-355.
- Psotka, M.A., Obata, F., Kolling, G.L., Gross, L.K., Saleem, M.A., Satchell, S.C., Mathieson, P.W., and Obrig, T.G. (2009). Shiga toxin 2 targets the murine renal collecting duct epithelium. *Infect Immun* 77, 959-969.
- Radbruch, A., ed. (2000). *Flow Cytometry and Cell Sorting* 2(nd) Edition edn (Springer-Verlag).
- Ravetch, J.V., and Clynes, R.A. (1998). Divergent roles for Fc receptors and complement in vivo. *Annu Rev Immunol* 16, 421-432.
- Ravetch, J.V., and Kinet, J.P. (1991). Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 9, 457-492.
- Rawal, N., and Pangburn, M.K. (2003). Formation of high affinity C5 convertase of the classical pathway of complement. *J Biol Chem* 278, 38476-38483.

- Raynal, P., and Pollard, H.B. (1994). Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1197, 63-93.
- Reddy, M.P., Kinney, C.A., Chaikin, M.A., Payne, A., Fishman-Lobell, J., Tsui, P., Dal Monte, P.R., Doyle, M.L., Brigham-Burke, M.R., Anderson, D., *et al.* (2000). Elimination of Fc receptor-dependent effector functions of a modified IgG4 monoclonal antibody to human CD4. *J Immunol* 164, 1925-1933.
- Reth, M., Hammerling, G.J., and Rajewsky, K. (1978). Analysis of the repertoire of anti-NP antibodies in C57BL/6 mice by cell fusion. I. Characterization of antibody families in the primary and hyperimmune response. *Eur J Immunol* 8, 393-400.
- Rider, D.A., Havenith, C.E., de Ridder, R., Schuurman, J., Favre, C., Cooper, J.C., Walker, S., Baadsgaard, O., Marschner, S., vandeWinkel, J.G., *et al.* (2007). A human CD4 monoclonal antibody for the treatment of T-cell lymphoma combines inhibition of T-cell signaling by a dual mechanism with potent Fc-dependent effector activity. *Cancer Res* 67, 9945-9953.
- Riley, J.L., and June, C.H. (2005). The CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation. *Blood* 105, 13-21.
- Sanchez-Mejorada, G., and Rosales, C. (1998). Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. *J Leukoc Biol* 63, 521-533.
- Sander, B., Andersson, J., and Andersson, U. (1991). Assessment of cytokines by immunofluorescence and the paraformaldehyde-saponin procedure. *Immunol Rev* 119, 65-93.
- Sato, T., Kanai, T., Watanabe, M., Sakuraba, A., Okamoto, S., Nakai, T., Okazawa, A., Inoue, N., Totsuka, T., Yamazaki, M., *et al.* (2004). Hyperexpression of inducible costimulator and its contribution on lamina propria T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 126, 829-839.
- Scott, B.G., Yang, H., Tuzun, E., Dong, C., Flavell, R.A., and Christadoss, P. (2004). ICOS is essential for the development of experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 153, 16-25.
- Shilling, R.A., Bandukwala, H.S., and Sperling, A.I. (2006). Regulation of T:B cell interactions by the inducible costimulator molecule: does ICOS "induce" disease? *Clin Immunol* 121, 13-18.
- Siberil, S., Dutertre, C.A., Fridman, W.H., and Teillaud, J.L. (2007). FcgammaR: The key to optimize therapeutic antibodies? *Crit Rev Oncol Hematol* 62, 26-33.
- Smith, A.M., and Nie, S. (2009). Next-generation quantum dots. *Nat Biotechnol* 27, 732-733.

- Takai, T., Li, M., Sylvestre, D., Clynes, R., and Ravetch, J.V. (1994). FcR gamma chain deletion results in pleiotrophic effector cell defects. *Cell* 76, 519-529.
- Takai, T., Ono, M., Hikida, M., Ohmori, H., and Ravetch, J.V. (1996). Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc gamma RII-deficient mice. *Nature* 379, 346-349.
- Taylor, P.R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H.H., Brown, G.D., and Gordon, S. (2005). Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol* 23, 901-944.
- Tian, H., Lempicki, R., King, L., Donoghue, E., Samelson, L.E., and Cohen, D.I. (1996). HIV envelope-directed signaling aberrancies and cell death of CD4<sup>+</sup> T cells in the absence of TCR co-stimulation. *Int Immunol* 8, 65-74.
- Tomonari, K. (1988). A rat antibody against a structure functionally related to the mouse T-cell receptor/T3 complex. *Immunogenetics* 28, 455-458.
- Uchida, J., Hamaguchi, Y., Oliver, J.A., Ravetch, J.V., Poe, J.C., Haas, K.M., and Tedder, T.F. (2004). The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy. *J Exp Med* 199, 1659-1669.
- van den Berg, T.K., Breve, J.J., Damoiseaux, J.G., Dopp, E.A., Kelm, S., Crocker, P.R., Dijkstra, C.D., and Kraal, G. (1992). Sialoadhesin on macrophages: its identification as a lymphocyte adhesion molecule. *J Exp Med* 176, 647-655.
- Van Rooijen, N., Kors, N., and Kraal, G. (1989). Macrophage subset repopulation in the spleen: differential kinetics after liposome-mediated elimination. *J Leukoc Biol* 45, 97-104.
- Van Rooijen, N., and Sanders, A. (1994). Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods* 174, 83-93.
- Wang, Z.H., Liao, Y.H., Yuan, J., Zhang, L., Wang, M., Zhang, J.H., Liu, Z.P., and Dong, J.H. (2007). A therapeutic anti-CD4 monoclonal antibody inhibits T cell receptor signal transduction in mouse autoimmune cardiomyopathy. *Chin Med J (Engl)* 120, 1319-1325.
- Wang, Z.Q., Dudhane, A., Orlikowsky, T., Clarke, K., Li, X., Darzynkiewicz, Z., and Hoffmann, M.K. (1994). CD4 engagement induces Fas antigen-dependent apoptosis of T cells in vivo. *Eur J Immunol* 24, 1549-1552.
- Willis, S.N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J.I., Adams, J.M., and Huang, D.C. (2005). Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev* 19, 1294-1305.
- Willis, S.N., Fletcher, J.I., Kaufmann, T., van Delft, M.F., Chen, L., Czabotar, P.E., Ierino, H., Lee, E.F., Fairlie, W.D., Bouillet, P., *et al.* (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 315, 856-859.

Wofsy, D., Mayes, D.C., Woodcock, J., and Seaman, W.E. (1985). Inhibition of humoral immunity in vivo by monoclonal antibody to L3T4: studies with soluble antigens in intact mice. *J Immunol* 135, 1698-1701.

Yousaf, N., and Williams, B.D. (1999). Monoclonal IgG antibodies influence the migration patterns of lymphocytes in vivo. *Int Arch Allergy Immunol* 118, 59-66.

## Abkürzungsverzeichnis

ACAD	autonomer Tod aktivierter Zellen
ADCC	Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AICD	Aktivierungs-induzierter Zelltod
APC	Allophycocyanin
A647	Alexa-Fluor647
A700	Alexa-Fluor700
BZ	B-Zelle
CDC	Komplement-abhängige Zytotoxizität
CD4 TZD	CD4 <sup>+</sup> T-Zelldepletion
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CR	Komplement-Rezeptor
CTLA-4	zytotoxische T-Lymphozyt-assoziiertes Protein 4
Cx	Komplement Komponente x
DAPI	4',6-Diamidine-2-phenylindole
Dig	Digoxigenin
DISC	Tod-induzierender Signal-Komplex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DZ	Dendritische Zelle
EAE	Experimentelle Allergische Encephalomyelitis
FcγR	Fcγ-Rezeptoren
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HIV	Humane-Immundefizienz-Virus
ICOS	induzierbarer Kostimulator
IFN-γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunohistochemie
IL-x	Interleukin-x
i.p.	intraperitoneal
ITAM	Immunrezeptor tyrosin-basiertes aktivierendes Motiv
ITIM	Immunrezeptor tyrosin-basiertes inhibierendes Motiv
i.v.	intravenös
Lk	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid (Endotoxin)
(m)Ak	(monoklonaler) Antikörper
MFI	mittle Fluoreszenzintensität

## Abkürzungsverzeichnis

---

β-ME	β-Mercaptoethanol
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
Ova	Ovalbumin
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
POD	Meerrettich-Peroxidase
PS	Phosphatidylserin
Q-VD-OPH	Quinolyl-valyl-O-methylaspartyl-[-2,6-difluorophenoxy]-methyl ketone
RA	Rheumatische Arthritis
R10F <sup>+</sup>	Zellkulturmedium mit FCS und Antibiotika
SLE	Systemischer Lupus Erythematosus
T <sub>CM</sub>	zentrale T-Gedächtniszelle
T <sub>EM</sub>	Effektor T-Gedächtniszelle
T <sub>naiv</sub>	naive T-Zelle
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAIL	TNF-verwandter Apoptose-induzierender Ligand
Treg	Regulatorische TZ
TZ	T-Zelle
TZR	T-Zell-Rezeptor
wt	Wildtyp

## **Danksagung**

Zu allererst möchte ich Herrn Prof. Dr. Richard A. KroczeK für die Bereitstellung dieses interessanten Themas danken.

Frau Dr. Michal Or-Guil danke ich für die unkomplizierte Übernahme der Betreuung an der Humboldt Universität zu Berlin und die freundliche Aufnahme in ihren Arbeitszirkel.

Besonders herzlicher Dank geht an alle „RAKer“, die mich nicht nur von Anfang an herzlich aufgenommen, sondern mir zu jeder Tages- und Nachtzeit mit fachlicher Kompetenz und absoluter Hilfsbereitschaft zur Seite gestanden haben. Danke auch für die vielen fröhlichen Stunden im Labor! Besonderer Dank geht dabei an Dr. Stephanie Gurka und Dr. Sylvia Worbs, die Berufliches und Privates bereitwillig vermischten und mich sowohl labortechnisch als auch freundschaftlich unter ihre Obhut genommen haben.

Dr. Hans-Werner Mages möchte ich für den besten „Büro-Senior“ danken, den ich mir vorstellen kann. Danke für die vielen lehrreichen privaten und fachlichen Diskussionsrunden.

Dr. Andreas Hutloff möchte ich ausdrücklich für die konstruktiven Diskussionsbeiträge und technischen Hilfestellungen danken, die er mir trotz eigener Arbeitsgruppe und notorischem Zeitmangel zukommen ließ.

Ich danke den Tierpflegern des Robert Koch-Instituts, besonders Nicole Wagner, die sich nicht nur zuverlässig um die Tiere kümmerten, sondern auch mit Interesse bei den tierexperimentellen Arbeiten geholfen haben.

Bei Prof. J. E. Gessner möchte ich mich für die Bereitstellung der C3-, Fc $\gamma$ RI-, Fc $\gamma$ RII-, Fc $\gamma$ RIII-, Fc $\gamma$ RI/III- bzw. FcR $\gamma$ -defizienten Mäuse bedanken.

Weiterer Dank geht an Dr. Falk Nimmerjahn, der mir den anti-Fc $\gamma$ RIV mAk zur Verfügung gestellt hat, ohne den ein Großteil dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zum Schluss danke ich noch meiner Familie und Freunden für ihr Vertrauen in mich, ihre Unterstützung und ihr Verständnis hinsichtlich meines chronischen Zeitmangels.